

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE Y DEL SITIO
RECEPTOR DE ANESTÉSICOS LOCALES EN DENDROBÁTIDOS**

CLAUDIA LORENA MOSQUERA GIL (Código: 1501311)

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS - FACULTAD DE SALUD
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FARMACOLOGÍA - UNIVALLE
SANTIAGO DE CALI
2018**

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE Y DEL SITIO
RECEPTOR DE ANESTÉSICOS LOCALES EN DENDROBÁTIDOS**

CLAUDIA LORENA MOSQUERA GIL (Código: 1501311)

**Trabajo de Grado presentado para optar el título de:
Magister en Ciencias Biomédicas**

Director:

RAFAEL SANTIAGO CASTAÑO VALENCIA, PhD

Asesores:

ADALBERTO SÁNCHEZ, PhD; LEONARDO FIERRO, PhD y FERNANDO CASTRO PhD

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS - FACULTAD DE SALUD
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FARMACOLOGÍA UNIVALLE
SANTIAGO DE CALI
2018**

TABLA DE CONTENIDO	PÁG
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	4
3. OBJETIVOS	7
3.1. Objetivo general	7
3.2. Objetivos específicos	7
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	8
4.1. Estructura y función de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)	8
4.1.1. Sitio de unión de toxinas y fármacos en los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)	15
4.2. Evolución de los Nav	22
4.3. Estructura, función y sitio receptor de AL	27
4.3.1. Estructura y función de los AL	27
4.3.2. Sitio receptor de AL	32
4.4. Ranas de la familia Dendrobatidae y su importancia como modelos para mapear el sitio receptor de anestésicos locales	40
4.4.1. <i>Colostethus fraterdanieli</i>	44
4.4.2. <i>Epipedobates boulengeri</i>	45
4.4.3. <i>Phyllobates aurotaenia</i>	46
4.4.4. <i>Oophaga histrionica</i>	47
4.4.5. Género <i>Andinobates</i>	48
4.4.5.1. <i>Andinobates bombetes</i>	49
4.4.5.2. <i>Andinobates minutus</i>	50
4.5. Canal de sodio de músculo esquelético de <i>Phyllobates aurotaenia</i> y sitio receptor de BTX) y AL	51
5. METODOLOGÍA	59
5.1. Marco legal vigente	59
5.2. Especies elegidas y área de muestreo	59
5.3. Fase de laboratorio	60
5.3.1. Número de especies capturadas y disección de músculo esquelético	60
5.3.2. Extracción del ARN total de músculo esquelético	61
5.4. Secuenciación del ARN total de músculo esquelético	62
5.5. Fase de bioinformática	63
5.5.1. Verificación de calidad ensamblado y alineamiento de secuencias	63
5.5.2. Búsqueda de secuencias de ADNc que codifican para la subunidad α de los Nav1.4	64
5.5.3. Búsqueda del marco abierto de lectura (ORF)	65
5.5.4. Alineamiento y caracterización de la estructura primaria de la subunidad α de los Nav1.4	66
5.5.5. Construcción de árboles filogenéticos de secuencias primarias, dominios y motivos funcionales y estructurales de los Nav1.4	66
5.5.6. Identificación de residuos involucrados en inactivación rápida y lenta	67

5.5.7. Construcción de árboles filogenéticos de los segmentos implicados en el sitio receptor de AL y BTX en los Nav1.4	67
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
6.1. CAPÍTULO I: Descripción de las secuencias primarias que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las especies de estudio	68
6.1.1. Extracción de ARN total de músculo esquelético	68
6.1.2. Fase de bioinformática	70
6.1.2.1. Verificación de calidad, ensamblado y alineamiento de las secuencias obtenidas	65
6.1.2.2. Secuencias de ADNc que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las especies de estudio	74
6.1.2.3. ORF de las especies de estudio	75
6.1.2.4. Alineamiento y caracterización de la estructura primaria que codifica para la subunidad α de los Nav1.4 de las especies de estudio	77
6.1.3. Conclusiones Capítulo I	84
6.2. CAPITULO II: Comparación de las secuencias primarias completas, dominios y motivos funcionales y estructurales por medio de árboles filogenéticos e identificación de residuos involucrados en inactivación rápida y lenta de los Nav1.4 de las especies de estudio	86
6.2.1. Árbol filogenético de la secuencia primaria completa de los Nav1.4	86
6.2.2. Árboles filogenéticos y residuos involucrados en inactivación rápida y lenta de los cuatro dominios homólogos de los Nav1.4	89
6.2.2.1. Árbol filogenético del dominio I	89
6.2.2.2. Árbol filogenético del dominio II	91
6.2.2.3. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el dominio II	92
6.2.2.4. Árbol filogenético del dominio III	94
6.2.2.5. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el dominio III	95
6.2.2.6. Árbol filogenético del dominio IV	97
6.2.2.7. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el dominio IV	98
6.2.3. Árboles filogenéticos y predicción de estructura secundaria de los extremo amino y carboxilo terminal de los Nav1.4	101
6.2.3.1. Árbol filogenético del extremo amino terminal	101
6.2.3.2. Predicción de la estructura secundaria del extremo amino terminal	102
6.2.3.3. Árbol filogenético del extremo carboxilo terminal	104
6.2.3.4. Predicción de la estructura secundaria del extremo carboxilo terminal	105
6.2.4. Árboles filogenéticos, predicción de estructura secundaria y residuos involucrados en inactivación rápida y lenta de los bucles que unen cada uno de los dominios de los Nav1.4	107
6.2.4.1. Árbol filogenético del bucle entre el dominio I y II	107
6.2.4.2. Predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio I y II	108
6.2.4.3. Árbol filogenético del bucle entre el dominio II y III	110
6.2.4.4. Predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio II y III	111
6.2.4.5. Árbol filogenético del bucle entre el dominio III y IV	113
6.2.4.6. Predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio III y IV	114
6.2.4.7. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el bucle entre el dominio III y IV	116

6.2.5. Árboles filogenéticos y residuos involucrados en inactivación rápida y lenta de los segmentos formadores del poro en cada uno de los dominios de los Nav1.4	118
6.2.5.1. Árbol filogenético del segmento S5, del bucle P y del segmento S6 del dominio I	118
6.2.5.2. Residuos involucrados en inactivación lenta en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio I	119
6.2.5.3. Árbol filogenético del segmento S5, del bucle P y del segmento S6 del dominio II	121
6.2.5.4. Residuos involucrados en inactivación lenta en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio II	122
6.2.5.5. Árbol filogenético del segmento S5, del bucle P y del segmento S6 del dominio III	125
6.2.5.6. Residuos involucrados en inactivación lenta en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio III	126
6.2.5.7. Árbol filogenético del segmento S5, del bucle P y del segmento S6 del dominio IV	129
6.2.5.8. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio IV	130
6.2.6. Conclusiones Capítulo II	133
 6.3. CAPITULO III: Comparación de los residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX de Nav de rata con las secuencias obtenidas de Nav1.4 de las especies de estudio	 136
6.3.1. Residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX y árbol filogenético del DIS6	137
6.3.2. Residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX y árbol filogenético del DIIS6	140
6.3.3. Residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX y árbol filogenético del DIIS6	143
6.3.4. Residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX y árbol filogenético del DIVS6	146
6.3.5. Conclusiones Capítulo III	149
 7. RECOMENDACIONES	 151
 8. BIBLIOGRAFÍA	 152

Fig. 1 Estructura primaria de la subunidad α de los Nav.	10
Fig. 2 Estructura terciaria del Nav bacteriano.	10
Fig. 3 Estados del canal de sodio dependiente de voltaje y la corriente asociada a cada uno de los tres estados.	12
Fig. 4 Motivo IFM del canal Nav.	13
Fig. 5 Diagrama con los diferentes estados de los Nav.	14
Fig. 6 Localización de los sitios receptores de neurotoxinas en canal de sodio mamífero.	16
Fig. 7 Estructura química de la tetrodotoxina y la saxitoxina.	17
Fig. 8 Estructura de las toxinas solubles en lípidos.	18
Fig. 9 Diagrama esquemático de la estructura de los canales iónicos.	22
Fig. 10 Diagrama esquemático de las duplicaciones intragénicas que se presume dieron lugar a los genes de los canales de Ca^{2+} y Na^{+} modernos.	23
Fig. 11 Árbol filogenético por Máxima parsimonia, donde se muestra la relación entre los cuatro dominios de los canales NaI (canal de Na^{+} de cerebro de rata) y CaSk (canal de Ca^{2+} de musculo esquelético de conejo).	24
Fig. 12 Árbol filogenético por método de máxima verosimilitud de la familia de los canales Nav.	25
Fig. 13 Estructura química de la cocaína.	28
Fig. 14 Componentes estructurales de los anestésicos locales.	28
Fig. 15 Acción de los anestésicos locales.	30
Fig. 16 Estructura química de algunos anestésicos locales.	30
Fig. 17 Estructura química de QX-314.	31
Fig. 18 Residuos en el IVS6 importantes en la unión de AL.	33
Fig. 19 Unión de lamotrigina al segmento IIIS6 y IVS6 del canal de sodio de cerebro de rata.	34
Fig. 20 Unión de etidocaína al segmento IS6, IIIS6 y IVS6 del canal de sodio de cerebro de rata.	35
Fig. 21 Representación de los segmentos S6 de los cuatro dominios.	36
Fig. 22 Subunidad α del canal de Na^{+} , donde se muestra los sitios de unión de BTX y AL.	37
Fig. 23 Modelo de unión de la BTX al segmento IS6 y IVS6 del canal de Na^{+} de cerebro de rata.	38
Fig. 24 Secuencia de aminoácidos del segmento transmembrana S6 en los dominios DI–DIV del canal de Na^{+} de músculo de rata.	39
Fig. 25 Taxonomía propuesta de la superfamilia Dendrobatoidea.	40
Fig. 26 Curva dosis respuesta de la variante natural del canal de músculo esquelético de rata ($\mu 1$) y el canal resistente a BTX ($\mu 1$ -N434K) con QX-314, lidocaína, etidocaína y benzocaína.	44
Fig. 27 <i>Colostethus fraterdanieli</i> .	45
Fig. 28 <i>Epipedobates boulengeri</i> .	46
Fig. 29 <i>Phyllobates aurotaenia</i> .	47
Fig. 30 <i>Oophaga histrionica</i> .	48
Fig. 31 <i>Andinobates bombetes</i> .	49
Fig. 32 <i>Andinobates minutus</i> .	50
Fig. 33 Estructura primaria del canal Nav1.4 de <i>Phyllobates aurotaenia</i> .	53
Fig. 34 Protocolo de transformación para promover la unión de la BTX a los Nav.	54
Fig. 35 Sensibilidad a la BTX.	54
Fig. 36 Recuperación de la inactivación lenta en canales expuestos a bupivacaina.	56

Fig. 37 Representación topológica de Nav.	58
Fig. 38 Diagrama de flujo de la extracción de ARN total.	61
Fig. 39 Diagrama del proceso de secuenciación.	62
Fig. 40 Diagrama de flujo RNA-seq.	63
Fig. 41 Aplicación utilizada para búsqueda de secuencias primarias de Nav.	64
Fig. 42 Interfaz del programa ORFfinder.	65
Fig. 43 Electroforesis en gel de agarosa para cada una de las especies de estudio.	69
Fig. 44 Resultado del análisis de los 12 módulos con la herramienta FastQC.	71
Fig. 45 Módulos del análisis con FastQC que presentan signo de exclamación.	72
Fig. 46 Módulos del análisis con FastQC que presentan posibles fallas.	73
Fig. 47 ORF's encontrados para la secuencia de <i>Phyllobates aurotaenia</i> .	76
Fig. 48 Resultado obtenido del SmartBLAST para el ORF17 de la figura anterior.	77
Fig. 49 Alineamiento múltiple de la estructura primaria de los Nav1.4 de las seis especies de estudio, de <i>E. johnstonei</i> , de <i>R. norvegicus</i> y de <i>P. aurotaenia</i> 2.	78
Fig. 50 Estructura primaria de la subunidad α del Nav de <i>P. aurotaenia</i> .	82
Fig. 51 Árbol filogenético de la secuencia completa de los Nav1.4.	87
Fig. 52 Relaciones filogenéticas entre géneros de la superfamilia Dendrobatoidea.	88
Fig. 53 Árbol filogenético del dominio I de los Nav1.4.	89
Fig. 54 Árbol filogenético del dominio II de los Nav1.4.	91
Fig. 55 Estructura primaria de los seis segmentos transmembrana del dominio II de <i>P. aurotaenia</i> .	93
Fig. 56 Árbol filogenético del dominio III de los Nav1.4.	94
Fig. 57 Estructura primaria de los seis segmentos transmembrana del dominio III de <i>P. aurotaenia</i> .	96
Fig. 58 Árbol filogenético del dominio IV de los Nav1.4.	97
Fig. 59 Estructura primaria de los seis segmentos transmembrana del dominio IV de <i>P. aurotaenia</i> .	99
Fig. 60 Árbol filogenético del extremo amino terminal de los Nav1.4.	101
Fig. 61 Predicción de estructura secundaria del extremo N-terminal de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP.	103
Fig. 62 Árbol filogenético del extremo carboxilo terminal de los Nav1.4.	104
Fig. 63 Predicción de estructura secundaria del extremo C-terminal de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP.	106
Fig. 64 Árbol filogenético del bucle entre dominio I y II de los Nav1.4.	107
Fig. 65 Predicción de estructura secundaria del bucle entre el dominio I y II de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP.	109
Fig. 66 Árbol filogenético del bucle entre dominio II y III de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (402 repeticiones).	110
Fig. 67 Predicción de estructura secundaria del bucle entre el dominio II y III de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP.	112
Fig. 68 Árbol filogenético del bucle entre dominio III y IV de los Nav1.4.	113
Fig. 69 Predicción de estructura secundaria del bucle entre el dominio III y IV de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP.	115
Fig. 70 Estructura primaria del bucle entre el dominio III y IV de <i>P. aurotaenia</i> .	116
Fig. 71 Árbol filogenético del segmento S5, bucle P y del segmento S6 del dominio I de los Nav1.4.	118

Fig. 72 Estructura primaria del segmento S5, bucle P y S6 del dominio I de <i>P. aurotaenia</i> .	120
Fig. 73 Árbol filogenético del segmento S5, bucle P y del segmento S6 del dominio II de los Nav1.4.	121
Fig. 74 Estructura primaria del segmento S5, bucle P y S6 del dominio II de <i>P. aurotaenia</i> .	123
Fig. 75 Árbol filogenético del segmento S5, bucle P y del segmento S6 del dominio III de los Nav1.4.	125
Fig. 76 Estructura primaria del segmento S5, bucle P y S6 del dominio III de <i>P. aurotaenia</i> .	127
Fig. 77 Árbol filogenético del segmento S5, bucle P y del segmento S6 del dominio IV de los Nav1.4.	129
Fig. 78 Estructura primaria del segmento S5, bucle P y S6 del dominio IV de <i>P. aurotaenia</i> .	131
Fig. 79 Estructura primaria y árbol filogenético de DIS6.	137
Fig. 80 Estructura primaria y árbol filogenético de DIIS6.	140
Fig. 81 Estructura primaria y árbol filogenético de DIIS6.	143
Fig. 82 Estructura primaria y árbol filogenético de DIVS6.	146

Tabla 1	Subunidades α del canal de sodio de mamífero.	15
Tabla 2	Sitios receptores de neurotoxinas en los canales de sodio dependientes de voltaje.	16
Tabla 3	Secuencias reportadas de Nav de invertebrados.	26
Tabla 4	Concentración y pureza de las muestras de ARN total.	68
Tabla 5	Transcritos ensamblados con la herramienta Trinity.	74
Tabla 6	Transcritos de cada una de las especies con una longitud entre 6000 y 8000 pb.	75
Tabla 7	Longitud encontrada de cada una de las secuencias de Nav de las especies de estudio.	77

1. RESUMEN

En este proyecto se expone la obtención de siete nuevas secuencias completas (nunca reportadas en bancos de genes) de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje de músculo esquelético (Nav1.4) de seis ranas venenosas de la familia Dendrobatidae y de una rana de la familia Eleutherodactylidae, *Eleutherodactylus johnstonei*. El propósito principal del proyecto consistió en comparar las secuencias a nivel de dominios y estructuras secundarias con énfasis en residuos reportados como importantes en los procesos de inactivación rápida y lenta y residuos implicados en la unión de anestésicos locales (AL) y batracotoxina (BTX) al canal. Las secuencias que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de cada una de las especies de estudio, presentan una longitud aproximada 1820 aminoácidos y muestran un alto grado de conservación, compartiendo una similitud del 69,1% con la secuencia de Nav1.4 de *Rattus norvegicus*. Tanto el extremo amino como el extremo carboxilo terminal se encuentran altamente conservados, pero el extremo carboxilo terminal de la secuencia Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* presenta motivos sin predicción de plegamientos de estructura secundaria beta que contrasta con la presencia de esta estructura en las otras especies de estudio. A partir de este trabajo se puede postular la hipótesis de que este extremo intracelular puede interactuar con el segmento IFM (Isoleucina, Fenilalanina y Metionina) o con otros mecanismos implicados en la inactivación rápida y posiblemente con la inactivación lenta del canal, mecanismos que sugieren que interfieren con la unión de BTX o AL al canal. Sin embargo, estos hallazgos deben ser verificados con experimentos funcionales posteriores. Las principales diferencias se presentan en la estructura primaria de los bucles intracelulares que unen los dominios, siendo el bucle entre el dominio I y II el menos conservado en todas las especies de estudio, con una similitud del 33,1% comparado con la especie externa. Con respecto a las 21 mutaciones implicadas en la modulación de la inactivación rápida y las 13 implicadas en la modulación de la inactivación lenta (reportadas por otros autores y para otras especies) en los Nav1.4, solo el residuo V754 en Nav1.4 de rata presenta la sustitución por una Isoleucina en algunas de las especies de estudio. Se encontraron sustituciones en algunos residuos involucrados con inactivación rápida y lenta en algunas de las especies de estudio, sin embargo, no han sido estudiadas hasta el momento. De la misma manera los 12 residuos involucrados con sitio receptor de AL y los siete residuos involucrados con sitio receptor de BTX y AL, sólo se encontraron tres reemplazos de aminoácidos en todas las especies de estudio incluida la especie *E. johnstonei*, sin embargo, son igualmente reemplazos que no han sido evaluados hasta el momento. Tarvin y colaboradores en el 2016 reportaron que los reemplazos en los residuos (S429A, I433V, A446D, A446E, V1583I y N1584T) presentes en DIS6 y DIVS6 están relacionados con la resistencia a toxinas en Nav1.4 de dendrobátidos, sin embargo en este proyecto se encontró que de los seis reemplazos cuatro de ellos están presentes solamente en *Phyllobates aurotaenia* (A429, V433, D446 y I1583) y uno de ellos esta

presentes en todas las especies de dendrobátidos (D446) a excepción de *Colostethus fraterdanieli* y la especie control *Eleutherodactylus johnstonei*.

2. INTRODUCCIÓN

Los anestésicos locales (AL) han sido usados en terapéutica para bloquear los estímulos nociceptivos, permitiendo de esta manera llevar a cabo procedimientos quirúrgicos en tejidos periféricos, con el fin de revertir el dolor agudo o tratar el dolor crónico. Los AL bloquean de manera reversible la conducción nerviosa, mostrando su efecto en cualquier membrana excitable; actúan evitando la propagación de los potenciales de acción en las fibras nerviosas, por medio del bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje; sin embargo, se conoce que estas moléculas también bloquean algunos canales de K^+ y Ca^{2+} (Bagal et al. 2012)(Smerilli and Sacot 2004). El bloqueo de los AL a los canales de K^+ y Ca^{2+} puede explicar los efectos secundarios y tóxicos de estos fármacos en órganos distintos del sistema nervioso periférico, especialmente si presentan diferentes sensibilidades (Scholz 2002).

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) están presentes en tejidos eléctricamente excitables como neuronas, músculo esquelético y cardíaco, son los responsables de la fase despolarizante del potencial de acción (Goldin 1999)(Catterall 2000). Los Nav están formados por una subunidad α y una o dos subunidades β (Catterall 2000). Las subunidades β , tienen un peso molecular entre 33 y 36 KDa y están implicadas en la inserción de la subunidad α en la membrana y en la modulación de la inactivación del canal (Isom et al. 1992)(Isom et al. 1995). La subunidad α , tiene un peso molecular de 260 KDa y está formada de aproximadamente 2000 aminoácidos, organizados en cuatro dominios homólogos, cada uno de los dominios contiene seis segmentos transmembrana, denominados de S1 a S6. Los cuatro primeros segmentos transmembrana de cada uno de los cuatro dominios, forman el sensor de voltaje, mientras que los segmentos S5 y S6 forman el poro del canal, con un bucle P entre ellos (Catterall 2000). El filtro de selectividad del canal está formado por un anillo de cuatro residuos, que se encuentran en el bucle P de cada uno de los cuatro dominios y es conocido como motivo DEKA (Aspartato, Glutamato, Lisina y Alanina) (Heinemann et al. 1992)(Lipkind and Fozzard 2008). Las corrientes de Na^+ son de gran amplitud, sin embargo, solo duran unos pocos milisegundos, posteriormente el canal se vuelve impermeable al ion por un proceso conocido como inactivación rápida, el cual es mediado por tres residuos que se encuentran en el bucle intracelular entre el dominio III y IV y conforman el motivo IFM.

Los Nav son blancos moleculares de varias neurotoxinas y de algunos fármacos entre ellos los AL, antiarrítmicos y algunos anticonvulsivantes (Catterall 1980)(Clare et al. 2000) y por lo tanto son usados para el tratamiento de trastornos asociados a hiperexcitabilidad neuronal y muscular como epilepsia, dolor neuropático, enfermedades

neurodegenerativas, espasticidad y algunas arritmias cardíacas (Tarnawa, Bölskei, and Kocsis 2007).

Los mecanismos moleculares por los cuales los AL alteran la función de Nav no está del todo clara. Sin embargo, con el conocimiento de la estructura molecular de los Nav, especialmente de la subunidad α formadora del poro, ha sido posible acercarse al sitio receptor de AL (Scholz 2002). Cálculos biofísicos basados en el campo eléctrico a través de la membrana celular, sugieren que el sitio de unión de los AL se encuentra a una distancia de la superficie externa de la membrana de aproximadamente 60% del diámetro de la membrana, es decir el sitio receptor posiblemente se encuentra protegido en el poro y para lograr el bloqueo se necesita la apertura del canal (Scholz 2002).

Los sitios receptores de los AL en Nav, hasta el momento, no han sido revelados mediante la técnica de cristalografía, como tampoco, mediante RMN. Sólo se han dado aproximaciones de estructuras cristalográficas del poro de canales de potasio en bacterias y recientemente, se logró un acercamiento de la estructura de un Nav mediante esta misma técnica. Las interacciones entre AL y Nav, se han realizado mediante experimentos de mapeo con mutaciones sitio-dirigidas, expresando canales Nav por vía heteróloga y desarrollando experimentos electrofisiológicos y farmacológicos para estimar la sensibilidad de estos canales a los AL. Con estas metodologías, se ha sugerido que el sitio receptor de los AL se encuentra en el poro de los Nav, específicamente en los segmentos S6 de los cuatro dominios.

Procedimientos en los que se inducen mutaciones sitio-dirigidas sobre los Nav (y en general para cualquier receptor proteico) para dilucidar los sitios receptores, han sido útiles para hallar interacciones específicas entre canales y fármacos. Sin embargo, debido al grado de aleatoriedad de escogencia de las mutaciones y los insumos bioquímicos y biotecnológicos que requiere el hacer estas mutaciones, este tipo de técnica representa un costo elevado. Hoy en día, para el diseño de nuevos fármacos, se propone conocer los bolsillos de los receptores, los sitios de interacción y unión para dirigir el diseño y la síntesis de moléculas (de forma específica para el bolsillo del receptor).

El sitio de unión de la batracotoxina (BTX) se encuentra en la parte exterior del poro y parece influir en la potencia de unión de AL en las regiones internas del poro. La BTX altera la apertura de los canales Nav y hace que estos canales se abran de forma persistente, mientras que los AL bloquean la conductancia del Na^+ (Scholz 2002)(Wang, Nau, and Wang 2000). La unión de BTX y AL es dependiente del estado, los AL se unen

preferiblemente al estado inactivado mientras que la BTX se une a su sitio receptor cuando el canal está abierto(Hille 2001).

Los AL son antagonistas de la BTX, este antagonismo se sugiere que es debido a una interacción alostérica indirecta de estos dos ligandos(Wang, Nau, and Wang 2000). Los receptores de BTX y AL han sido mapeados en residuos comunes del segmento transmembrana S6 del dominio I, III y IV de la subunidad α del canal de Na^+ (Wang, Nau, and Wang 2000). Recientemente se realizó un estudio por medio de experimentos electrofisiológicos, donde se demostró que el Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* es insensible a la bupivacaina, siendo este fármaco uno de los AL más cardiotóxicos (Castaño 2011).

Por esta razón se considera que el estudio de los Nav1.4 de ranas que pertenecen a la familia Dendrobatidae a la cual pertenece *Phyllobates aurotaenia*, podría arrojar información importante sobre el sitio de unión de los AL en los Nav1.4 de mamíferos; teniendo en cuenta que el análisis de las diferencias que existan entre los residuos aminoacídicos de la zona receptor para los AL debe ser relevante para la unión de los mismos a los Nav1.4 de mamíferos.

Con base en lo anterior, en este proyecto se propuso describir y comparar tanto las secuencias de aminoácidos primarias completas como las secuencias parciales de los dominios y motivos funcionales y estructurales involucrados en la interacción con AL de la subunidad α de los Nav1.4 de seis especies de dendrobátidos (*Phyllobates aurotaenia*, *Oophaga histrionica*, *Epipedobates boulengeri*, *Andinobates bombetes*, *Andinobates minutus* y *Colostethus fraterdanieli*) y de una especie control (*Eleutherodactylus johnstonei*). Todas estas secuencias a su vez fueron comparadas con la secuencia que codifica para la subunidad α de Nav1.4 de *Rattus norvegicus*.

La detección de mutaciones naturales presentes en los canales de dendrobátidos (en conjunto con futuros experimentos funcionales), que pudieran explicar el funcionamiento de los Nav y los sitios de unión de los AL, ahorrarán esfuerzos de investigación y recursos. Este estudio, además, permitirá conocer los aspectos evolutivos de la estructura y función de los Nav. Así mismo, permitirá tener una aproximación a la deducción de los sitios de unión y el bolsillo estructural de interacción entre los Nav y los AL, permitiendo en el futuro diseñar nuevos fármacos y terapias más específicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar las secuencias que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de seis especies de ranas de la familia Dendrobatidae y el sitio receptor de AL y BTX.

3.2. Objetivos específicos

- Describir las secuencias primarias que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de seis especies de dendrobátidos y una especie control.
- Comparar las secuencias primarias completas, dominios y motivos funcionales y estructurales de los Nav1.4 de seis especies de dendrobátidos y una especie control con el Nav1.4 de rata por medio de árboles filogenéticos e identificar residuos involucrados en inactivación rápida y lenta.
- Comparar los residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX de Nav de rata con las secuencias obtenidas de Nav1.4 de seis especies de dendrobátidos y una especie control

4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1. Estructura y función de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)

Los canales dependientes de voltaje son proteínas que permiten el paso de iones a través de la membrana celular, regulados por la diferencia de voltaje alrededor de la membrana. Entre estos canales se encuentran los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav), los cuales están presentes en tejidos eléctricamente excitables como neuronas, músculo esquelético y cardíaco (Goldin 1999).

El trabajo realizado por Alan Hodgkin y Andrew Huxley en 1952, usando la técnica de “voltage clamp” en el estudio del potencial de acción en el axón gigante de calamar, demostró que las señales eléctricas en nervios son iniciadas por la activación de la corriente de Na^+ dependiente de voltaje, que transporta Na^+ hacia el interior de la célula; luego de 1-2 ms la corriente de Na^+ se inactivaba y la señal eléctrica se terminaba por la activación de la corriente de K^+ dependiente de voltaje, que transporta K^+ al exterior de la célula, restableciendo el equilibrio inicial de cargas eléctricas a través de la membrana (Hodgkin and Huxley 1952a)(Hodgkin and Huxley 1952d)(Hodgkin and Huxley 1952c)(Hodgkin and Huxley 1952b).

En la década de los 70's se demostró que las neurotoxinas actúan en múltiples sitios receptores para modificar la conductancia iónica y la dependencia de voltaje de los canales de Na^+ (Catterall 1980). En 1980, por medio de marcaje por fotoafinidad, se usaron toxinas de escorpiones para identificar las subunidades proteicas de los canales de Na^+ , encontrando una subunidad grande α de 260 kDa y una subunidad pequeña β de 30 a 40 kDa (Beneski and Catterall 1980). Posteriormente se realizó la purificación de los canales de Na^+ de cerebro, mostrando que están compuestos de una subunidad α , asociada con una subunidad β_1 de manera no covalente de 36 kDa y una subunidad β_2 unida por un puente disulfuro de 33 kDa (Hartshorne and Catterall 1984)(Hartshorne and Catterall 1981). Igualmente se purificó la subunidad α de la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*) y la subunidad α y una subunidad β_1 del músculo esquelético de rata (Barchi 1983).

La clonación y secuenciación del ADNc que codifica para la subunidad α , permitió definir su estructura primaria y mostrar que el ARNm que codifica para la subunidad α es suficiente para la expresión de los canales de sodio funcionales (Noda et al. 1984) (Noda et al. 1986) (Goldin et al. 1986). Mientras que las subunidades β modulan la cinética, la dependencia de voltaje de la activación e inactivación y funcionan como moléculas de adhesión celular (Isom et al. 1992) (Isom et al. 1995).

La subunidad α del canal de Na^+ está formada de aproximadamente 2000 residuos de aminoácidos, organizados en cuatro dominios homólogos, cada uno de los dominios contiene seis segmentos transmembrana, denominados de S1 a S6. Los cuatro primeros segmentos transmembrana (S1 a S4) de cada uno de los cuatro dominios, forman el dominio sensor de voltaje; mientras que los segmentos S5 y S6 de cada uno de los dominios forman el poro del canal, con un bucle P entre ellos, en cada bucle P existen dos segmentos cortos denominados SS1 y SS2, que abarcan parte de la membrana y neutralizan algunos de los residuos cargados positivamente en S4, los residuos encontrados en estos segmentos cortos, forman anillos internos y externos, que sirven como sitio receptor de la tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX) al igual que como filtro de selectividad en el poro externo del canal (**Fig. 1**) (Terlau et al. 1991) (Catterall 2000). La estructura de cristal del Nav de la bacteria *Arcobacter butzleri*, muestra como los cuatro dominios están dispuestos alrededor de un canal acuoso central formando el poro (**Fig. 2**) (Payandeh et al. 2011).

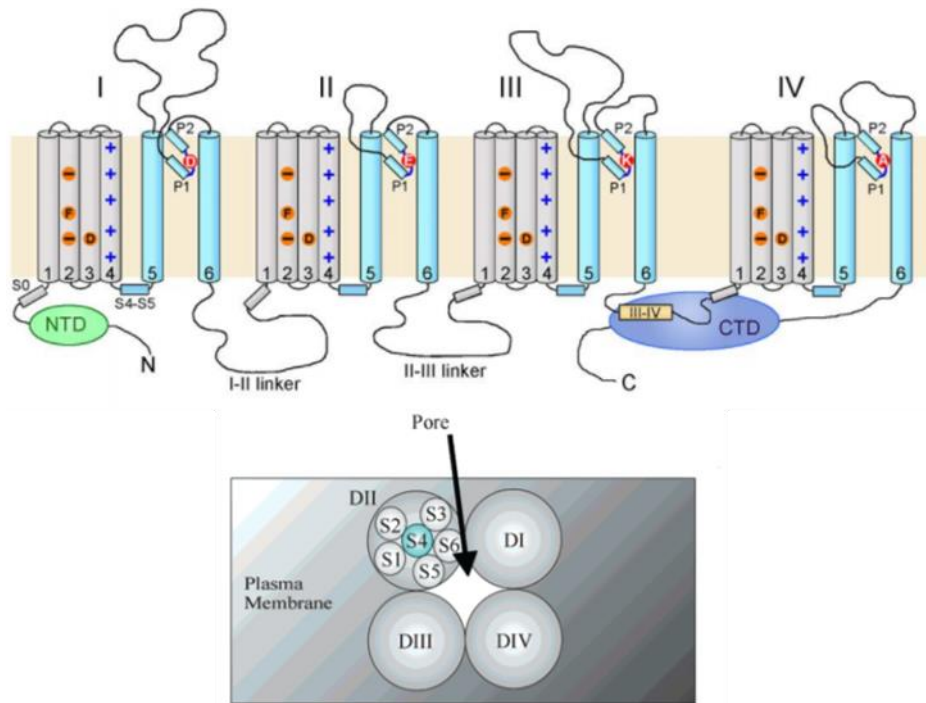


Fig. 1 Estructura primaria de la subunidad α de los Nav. (Shen et al. 2017)(Anger et al. 2001)

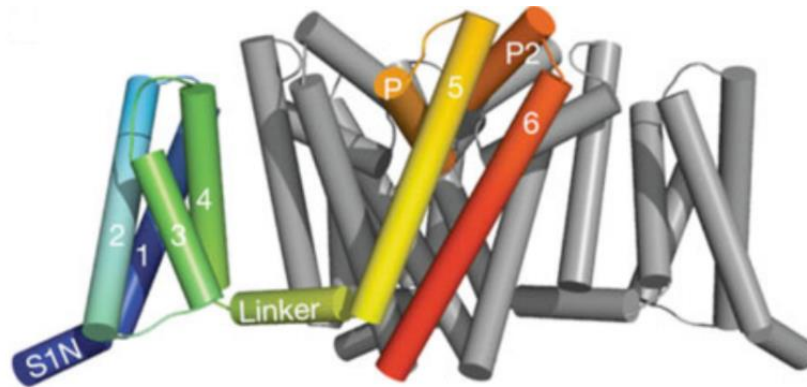


Fig. 2 Estructura terciaria del Nav bacteriano. El sensor de voltaje y el poro se conectan mediante el segmento de unión intracelular entre los segmentos cuatro y cinco (Payandeh et al. 2011).

El filtro de selectividad del canal de Na^+ está formado por un anillo de cuatro residuos, que se encuentran en el bucle P, Aspartato (D) en el dominio I, Glutamato (E) en el dominio II, Lisina (R) en el dominio III y Alanina (A) en el dominio IV, conocido como motivo DEKA (Heinemann et al. 1992)(Lipkind and Fozzard 2008). El ion Na^+ pasa hidratado a través del filtro de selectividad e interactúa con dos oxígenos del Glutamato (E); en cambio el K^+ no pasa fácilmente a través del canal, debido a que presenta una interacción más débil con el Glutamato (E), además la repulsión que presenta la Lisina (K) por este ion es más fuerte

que por el ion Na^+ (Lipkind and Fozzard 2008). Estudios previos han demostrado que el reemplazo de la Lisina (K) en el dominio III suprime la selectividad por el Na^+ y permite el ingreso de K^+ y Ca^{2+} (Favre, Moczydlowski, and Schild 1996)(Heinemann et al. 1992).

Los canales de Na^+ presentan tres estados funcionalmente distintos: Reposo (cerrado), activo (abierto) e inactivado (**Fig. 3**). En el potencial de reposo de la membrana, los canales se encuentran en su estado cerrado no conductor, en la despolarización se cree que los sensores de voltaje S4 (contienen entre 4 y 7 motivos repetidos de residuos cargados positivamente, usualmente Arginina (R), separados entre dos residuos hidrofóbicos (Catterall 1986a)(Catterall 1986b)), se mueven hacia la superficie extracelular ; este movimiento es transferido al poro por el segmento de unión intracelular, provocando un cambio conformacional que resulta en la apertura del canal por unos pocos milisegundos, después ocurre unos procesos conocidos como inactivación rápida y lenta, que llevan al canal a un estado inactivado no conductor. Después de la hiperpolarización de la membrana el canal de Na^+ regresa a su estado de reposo antes de la siguiente despolarización(Ruben 2014)(Bagal et al. 2015).

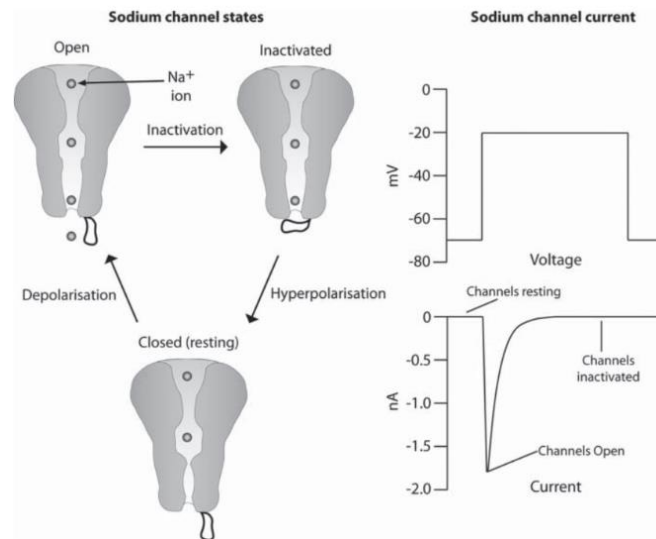


Fig. 3 Estados del canal de sodio dependiente de voltaje y la corriente asociada a cada uno de los tres estados. (Bagal et al. 2015)

Las corrientes de Na^+ en tejidos excitables son de gran amplitud, sin embargo, esta corriente solo dura unos pocos milisegundos, posteriormente el canal se vuelve impermeable al Na^+ por un proceso conocido como inactivación rápida, este proceso es mediado por tres residuos, en el bucle intracelular entre el dominio III y IV del canal, que conforman el motivo hidrofóbico IFM (Isoleucina (I), Fenilalanina (F), Metionina (M)). Esta compuerta de inactivación rápida sirve como una partícula de bloqueo intracelular que se pliega en la estructura de canal como una tapa articulada y bloquea el poro durante la inactivación, como se observa en la **Fig. 4** (Vassilev, Scheuer, and Catterall 1988).

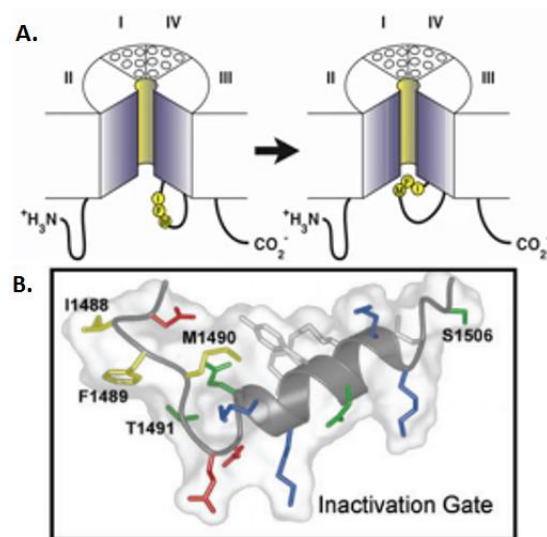


Fig. 4 Motivo IFM del canal Nav. **A.** Modelo del canal Nav con la compuerta de inactivación. **B.** Estructura tridimensional determinada por NMR de la compuerta de inactivación (Rohl et al. 1999).

Los canales de sodio también pasan por un proceso conocido como inactivación lenta, mientras que el inicio y la recuperación de la inactivación rápida ocurre en milisegundos, el inicio y la recuperación de la inactivación lenta ocurre en segundos; este proceso ocurre durante despolarizaciones repetitivas o prolongadas de los canales de Na^+ , limitando así la disponibilidad del canal durante largos periodos de tiempo. La estructura de cristal del canal sugiere que el proceso de inactivación lenta, puede ser debido a un continuo reordenamiento del canal, durante despolarizaciones prolongadas; lo que puede llevar a que colapse tanto el poro como el filtro de selectividad, evitando así la conducción del Na^+ (Richmond et al. 1998). Estudios de estructura y función han demostrado que cambios conformacionales en el filtro de selectividad y en el segmento S6 son claves en la transición al estado de inactivación lenta (Catterall 2014).

La inactivación modula la afinidad de los canales Nav por diversos agentes químicos en particular AL y fármacos de acción similar (Ulbricht 2005), por esta razón varios autores han reportado residuos involucrados tanto en inactivación rápida como en inactivación lenta (Z. Zhang et al. 2003) (Smith and Goldin 1997) (W. Xiong et al. 2003) (Vilin, Fujimoto, and Ruben 2001) (O'Reilly, Wang, and Wang 2001) (Ong, Tomaselli, and Balser 2000) (Todt et al. 1999) (J. Miller et al. 2000) (Kellenberger et al. 1997) (McCollum et al. 2003) (Mitrovic, George, and Horn 2000) (Featherstone, Fujimoto, and Ruben 1998) (Bai et al. 2003) (Vedantham and Cannon 2000). De igual manera la inactivación lenta puede afectarse por un gran número de enfermedades hereditarias del músculo esquelético que se presentan por mutaciones en la subunidad α del canal Nav1.4, se han realizado varios

estudios reportando las mutaciones involucradas con estas patologías (Struyk et al. 2000)(Cummins and Sigworth 1996)(Hayward, Brown, and Cannon 1997).

En la **Fig. 5** se observa una aproximación pictórica de la diferencia entre los dos procesos de inactivación.

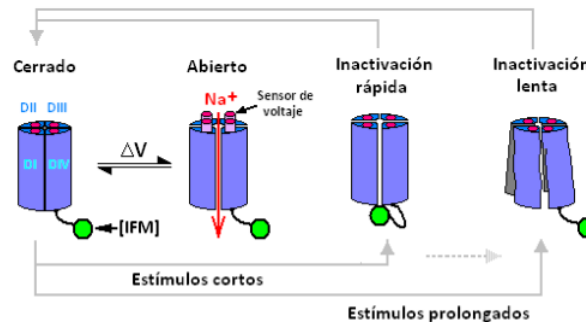


Fig. 5 Diagrama con los diferentes estados de los Nav. En el estado cerrado no hay conducción de iones a través del poro, el estado abierto generado por un cambio repentino de voltaje (estímulos cortos, produce el movimiento de los sensores de voltaje y permite el paso de iones a través del poro; pero este estado es bloqueado por la inactivación rápida. Y si el estímulo despolarizante es prolongado el canal presenta otra configuración conocida como inactivación lenta que al parecer no permite que el canal retorne a cualquiera de los estados anteriores^c.

Las subunidades α de los canales de sodio, están codificadas por 10 genes que se expresan en diferentes tejidos excitables (**Tabla 1**); en el sistema nervioso central (SNC) Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, en el sistema nervioso periférico (SNP) Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9, en musculo esquelético Nav1.4, en corazón Nav1.5 y existe otro canal de sodio, Na_x , el cual no es dependiente de voltaje(Watanabe et al. 2000). La mayoría de estos canales también presentan niveles significativos de expresión fuera de sus tejidos primarios(Goldin 2001).

Tabla 1 Subunidades α del canal de sodio de mamífero (Goldin 2001).

TIPO	SIMBOLO DEL GEN	TEJIDOS PRIMARIOS
Nav1.1	SCN1A	Neuronas del SNC*
Nav1.2	SCN2A	Neuronas del SNC*
Nav1.3	SCN3A	Neuronas del SNC*
Nav1.4	SCN4A	Músculo esquelético
Nav1.5	SCN5A	Músculo cardíaco
Nav1.6	SCN8A	Neuronas del SNC
Nav1.7	SCN9A	Neuronas del SNP
Nav1.8	SCN10A	Neuronas del GRD*
Nav1.9	SCN11A	Neuronas del GRD*
Na _x	SCN6A SCN7A	Útero, astrocitos, hipotálamo

**GRD: Ganglios de la Raíz Dorsal*

El canal de Na⁺ de músculo esquelético (Nav1.4) se aisló inicialmente de músculo esquelético de rata y fue llamado SkM1 o μ , se expresa en altos niveles en músculo esquelético adulto, en bajos niveles en músculo esquelético neonatal y no se expresa ni en cerebro ni en músculo cardíaco. Esta isoforma es sensible a concentraciones nanomolares de tetrodotoxina (TTX), de μ conotoxina GIIIA y μ conotoxina PIIIA (Goldin 2001).

4.1.1. Sitio de unión de toxinas y fármacos en los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)

Los Nav son blancos moleculares de varias neurotoxinas, las cuales alteran su función uniéndose a diferentes sitios receptores en el canal (Catterall 1980). Se han identificado seis sitios receptores, **Tabla 2** (Catterall 1992). También se ha propuesto sitios de unión para fármacos como AL, antiarrítmicos y algunos anticonvulsivantes; estos fármacos son utilizados para disminuir la actividad del canal de sodio en síndromes de hiperexcitabilidad; como arritmias cardíacas y convulsiones epilépticas (Clare et al. 2000) (Linford et al. 1998). La **Fig. 6** muestra los dominios estructurales y los sitios de unión de toxinas en los canales de Na⁺.

Tabla 2 Sitios receptores de neurotoxinas en los canales de sodio dependientes de voltaje (Catterall et al. 2007).

Receptor site	Neurotoxin	Functional effect
Site 1	Tetrodotoxin Saxitoxin μ -Conotoxin	Pore block
Site 2	Batrachotoxin Veratridine Grayanotoxin Aconitine	Persistent activation enhanced activation, and block of activation
Site 3	α -Scorpion toxins Sea anemone toxins Atrachotoxins	Slowed inactivation
Site 4	β -Scorpion toxins	Enhanced activation
Site 5	Brevetoxins Ciguatoxin	Enhanced activation and block of inactivation
Site 6	δ -Conotoxin	Slowed inactivation

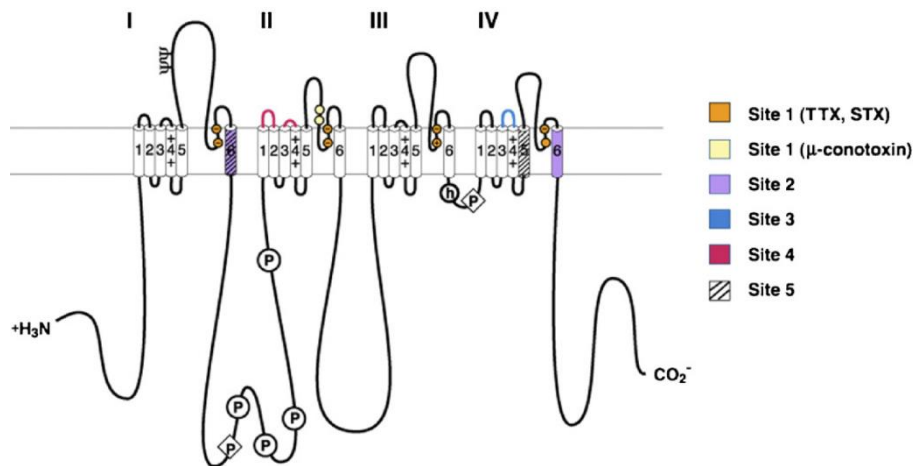


Fig. 6 Localización de los sitios receptores de neurotoxinas en canal de sodio mamífero (Catterall et al. 2007).

Sitio receptor 1 A este sitio se unen dos tipos de toxinas, las guanidinas heterocíclicas solubles en agua, la tetrodotoxina (TTX) y la saxitoxina (STX) y la neurotoxina peptídica μ conotoxina. Estas toxinas bloquean la conductancia del sodio (Catterall et al. 2007).

La TTX se encontró inicialmente en los ovarios y en el hígado del pez globo y más recientemente se ha encontrado en algunas especies de tritones, pulpos y ranas (Crone et al. 1976) (Kim, Brown, and Mosher 1975) (Sheumack et al. 1978) (Yasumoto et al. 1986), presenta efectos tóxicos en los sistemas neuromuscular, cardiovascular y respiratorio. Su estructura se muestra en la Fig. 7. La acción selectiva de esta toxina ha sido demostrada en nervios mielinizados, músculo esquelético y otras células de tejido excitable, en las cuales las corrientes de entrada de Na^+ son importantes para la generación del potencial de acción (Evans 1972) (Ritchie and Rogart 1977).

La STX es producida por el dinoflagelado *Gonyaulax catenella* y se encuentra en gran concentración en almejas, mejillones y otros mariscos que se alimentan de estos organismos (Schantz 1986). Su estructura se muestra en la Fig. 7.

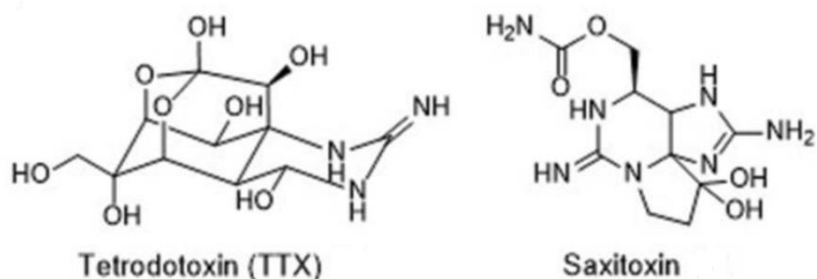


Fig. 7 Estructura química de la tetrodotoxina y la saxitoxina. (Bagal et al. 2015)

Las μ conotoxinas son una familia de toxinas peptídicas provenientes del veneno del caracol *Conus*, formadas de 20 a 25 residuos, de los cuales 6 son Cisteínas (C) que forman puentes disulfuro; algunas de las μ conotoxinas bien caracterizadas son GIIIA, PIIIA, SmIIIA and KIIIA (R. Chen, Robinson, and Chung 2014).

Los residuos que forman el sitio receptor 1 están localizados en el loop del poro y se cree que forman el filtro de selectividad (Narahashi, Moore, and Scott 1964) (Ritchie and Rogart 1977) (Noda et al. 1989) (Terlau et al. 1991). Se ha identificado el Glutamato (E) en la posición 387 en el bucle re-entrante a la membrana en el dominio I y residuos principalmente negativos en posiciones análogas en los cuatro dominios, como sitios de unión de TTX y STX a los canales de sodio (Ritchie and Rogart 1977) (Noda et al. 1989). Hay experimentos que muestran que las μ conotoxinas inhiben competitivamente la unión de TTX/STX en canales nativos, sin embargo, algunas de las mutaciones que afectan la

afinidad de TTX, no alteran la unión de la μ conotoxina, lo que sugiere que estas dos toxinas comparten un sitio receptor que se traslapa pero que no es idéntico (Catterall et al. 2007).

Sitio receptor 2 A este sitio se unen varias toxinas solubles en lípidos, aisladas de varias especies de plantas y de las ranas venenosas; como lo son la grayanotoxina y los alcaloides veratridina, aconitina y batracotoxina (BTX) (Albuquerque, Daly, and Witkop 1971)(Catterall 1980)(Khodorov 1985). La estructura química de cada una de estas toxinas se muestra en la **Fig. 8**. Estas toxinas causan activación prolongada de los canales de Na^+ en el potencial de reposo de la membrana, bloqueando la inactivación del canal de sodio y desplazando la activación del canal dependiente de voltaje a potenciales de membrana más negativos (Catterall 1992)(Ulbricht 1969). También alteran la selectividad iónica; por lo tanto, es probable que el sitio receptor se encuentre en la región que está envuelta en la activación dependiente de voltaje y la inactivación (Catterall 1980). Se ha encontrado que el sitio receptor 2 se encuentra en el segmento transmembrana S6 del dominio I y IV de la subunidad α del canal de Na^+ (Trainer, Brown, and Catterall 1996). Otros estudios han demostrado que residuos en el segmento S6 del dominio II y III son también importantes para la unión de BTX (S.-Y. Wang, Barile, and Wang 2001). Igualmente se ha encontrado que su sitio de unión se puede solapar parcialmente con el sitio de unión de anestésicos locales (G. Wang, Quan, and Wang 1998).

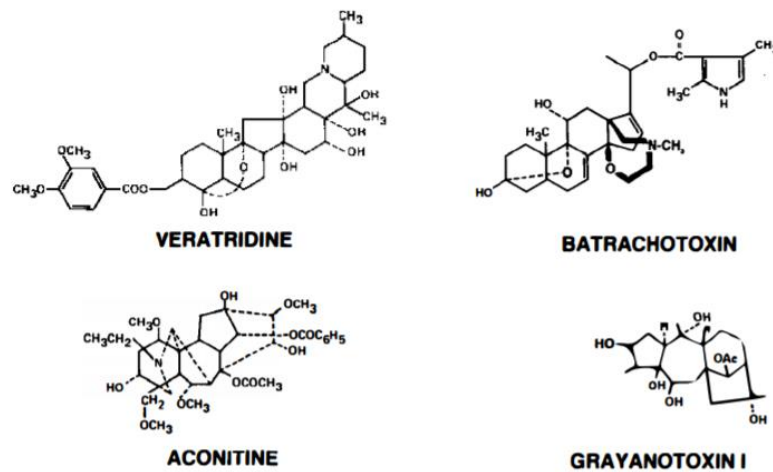


Fig. 8 Estructura de las toxinas solubles en lípidos. (Catterall 1980)

Las grayanotoxinas I,II y III son toxinas encontradas en las hojas de plantas de la familia Ericaceae y especialmente en el género *Aconitum* (Narahashi and Seyama 1974) (Seyama and Narahashi 1973). Las toxinas II y III son derivadas de la I. Despolarizan las membranas excitables de musculo esquelético, corazón y axón gigante de calamar por un incremento en la permeabilidad de sodio. La TTX inhibe las corrientes de sodio inducidas por grayanotoxina, mostrando que tienen diferentes sitios receptores(Deguchi and Sakai 1967)(Ku et al. 1977)

La veratridina es un alcaloide producido por las plantas de la familia Lilaceae. Este alcaloide produce contractura muscular, disparos repetitivos de nervios y ritmos cardiacos irregulares (Kramer and Acheson 1946). La veratridina causa despolarización del nervio debido a un incremento en la permeabilidad de sodio. La TTX inhibe la activación de la veratridina, lo que indica que estas dos toxinas tienen sitios receptores diferentes(Catterall 1975a).

La aconitina es un alcaloide producido por la planta *Aconitum napellus*. Este alcaloide produce arritmias de fibras ventriculares y de Purkinje y repetitivos potenciales y oscilaciones seguidos de la estimulación del nervio(Pepper and Trautwein 1967)(Herzog, Feibel, and Bryant 1964). Estos efectos son causados por la despolarización prolongada que impide la repolarización completa de la membrana excitable; y esta despolarización prolongada es bloqueada por la TTX. Se evaluó la acción de la aconitina en nervios mielinizados, por medio de la técnica de “voltage clamp” y mostró que este alcaloide modifica la dependencia de voltaje de la activación de los canales de sodio y bloquea la inactivación(Schmidt and Schmitt 1974).

La BTX es un alcaloide aislado de la piel de las ranas venenosas del género *Phylllobates*. Los efectos farmacológicos de este alcaloide resultan de la despolarización del nervio y musculo debido al aumento de la permeabilidad de sodio. La despolarización de membranas excitables generada por la BTX es completamente bloqueada por la TTX (Catterall 1975a)(Albuquerque, Daly, and Witkop 1971)(Narahashi, Albuquerque, and Deguchi 1971) (Albuquerque, Seyama, and Narahashi 1973)

Sitio receptor 3 A este sitio se unen toxinas polipeptídicas purificadas de venenos de escorpiones del Norte de África, conocidas como toxinas de escorpión α , de anemonas marinas y de algunas arañas(Catterall 1980)(Strichartz, Rando, and Wang 1987). Estas toxinas ralentizan o bloquean la inactivación del canal de sodio(Bergman et al. 1976)(Catterall 1980)(Lazdunski et al. 1986). Catterall y colaboradores han demostrado que la unión de las toxinas de escorpiones a su sitio receptor es altamente dependiente de voltaje(Catterall 1979)(Catterall, Ray, and Morrow 1976)(Ray, Morrow, and Catterall 1978). Lo anterior sugiere que el sitio receptor 3 está localizado en una región del canal de Na^+ que sufre un cambio conformacional durante la activación dependiente de voltaje, que bien puede ser el sensor de voltaje o estructuras envueltas en la compuerta de activación del canal(Rogers et al. 1996)(Catterall 1992). Estudios sugieren que el loop extracelular entre el segmento S5 y S6 del dominio I y IV y residuos en el loop extracelular entre el segmento S3 y S4 del dominio IV, están relacionados con la unión de este tipo de toxinas(Catterall et al. 2007).

Se han purificado las toxinas de escorpiones tanto del Norte de África como de América, en los dos continentes se han encontrado polipéptidos con un peso molecular de aproximadamente 7000, observándose homología en sus secuencias(Babin et al. 1975). Estas toxinas causan secreción de neurotransmisores, arritmias cardíacas, repetitivos disparos y despolarización en el nervio; que se debe principalmente a la modificación de las propiedades de los canales de Na^+ . Adam y colaboradores mostraron que los venenos de escorpiones causan despolarización y actividad espontánea de nervios mielinizados debido al incremento en la permeabilidad del sodio y a la duración prolongada de los potenciales de acción(Adam et al. 1966). Mientras que las toxinas purificadas que ralentizan la inactivación, tienen poco o ningún efecto sobre la permeabilidad del Na^+ en la membrana en reposo, por lo que no causan activación persistente de los canales de Na^+ en nervio o músculo esquelético(Romey et al. 1975)(Okamoto, Takahashi, and Yamashita 1977)(Catterall 1979). La acción de la toxina de escorpiones es bloqueada por la TTX, indicando que estas dos toxinas actúan en sitios separados(Catterall 1975b).

Las toxinas de anemonas fueron aisladas inicialmente de *Anemonia sulcata*, que se encuentran como polipéptidos con un peso molecular entre 2500 y 5000 (Béress, Béress, and Wunderer 1975)(Béress and Béress 1975). Las toxinas de anemonas y las toxinas de escorpiones presentan acciones similares en los canales de sodio, como inhibición de la inactivación, aumento de la activación persistente por las toxinas solubles en lípidos y la unión dependiente de voltaje(Catterall 1980).

Sitio receptor 4 A este sitio se unen otras toxinas de escorpiones que son homologas a las mencionadas anteriormente, estas toxinas se encuentran con mayor frecuencia en los venenos de escorpiones del nuevo mundo como *Centruroides sculpturatus* y *Tityus serrulatus*, son conocidas como toxinas de escorpión β (Couraud et al. 1982)(Lazdunski et al. 1986)(Strichartz, Rando, and Wang 1987). Su función es desplazar la activación dependiente de voltaje del canal de sodio hacia potenciales más negativos sin modificar la inactivación del canal (Cahalan 1975)(Couraud et al. 1982)(Meves, Rubly, and Watt 1982). Recientemente se encontró que la toxina de la araña *Macrothele gigas*, se une también al sitio receptor 4(Corzo et al. 2003). El mecanismo de acción de estas toxinas está relacionado con residuos específicos del loop entre los segmentos S1-S2 y S3-S4 del dominio II (Cestele et al. 1998).

Sitio receptor 5 A este sitio se unen dos toxinas solubles en lípidos con una masa molecular en el rango de los 1000 Da, las brevetoxinas y las ciguatoxinas, procedentes de los dinoflagelados *Karenia brevis* y *Gambierdinus toxicus* respectivamente(Catterall and Gainer 1985)(Lombet, Bidard, and Lazdunski 1987)(Poli, Mende, and Baden 1986)(Catterall et al. 2007). Estas toxinas causan disparos repetitivos en nervios, desplazamiento de la activación dependiente de voltaje del canal de Na^+ y bloqueo de la inactivación (Benoit, Legrand, and Dubois 1986). Los segmentos transmembrana IS6 y IVS5 participan en la formación del sitio receptor 5(Trainer et al. 1991).

Sitio receptor 6 A este sitio se une la neurotoxina δ -conotoxina y se encarga de ralentizar la inactivación del canal de sodio(Fainzilber et al. 1994). Estudios recientes indican que esta toxina interactúa con los residuos del segmento IVS4, cerca al sitio receptor 3, lo que sugiere que tienen el mismo mecanismo molecular de las toxinas de escorpión α (Leipold et al. 2005).

No solo las toxinas afectan la función de los canales de sodio, también existen fármacos que bloquean este tipo de canales, como los anestésicos locales (AL), antiarrítmicos y anticonvulsivantes(Bruhova, Tikhonov, and Zhorov 2008).

Los AL se pueden unir a cualquiera de los tres estados del canal de sodio, pero con diferente afinidad y alcanzar su sitio de unión a través de vías de acceso intracelular o extracelular. La inhibición de los canales de sodio por AL depende tanto del voltaje como de la frecuencia. Los estados de reposo en los cuales predominan los potenciales hiperpolarizados, los AL se unen con menor afinidad, mientras que en los estados abierto o inactivado, donde prevalecen más los potenciales de membrana despolarizados, los AL se unen con mayor afinidad(Li et al. 1999).

Los Nav son también blanco de algunos anticonvulsivantes como la lamotrigina, la fenitoína y la carbamazepina, los cuales muestran acción de bloqueo similar a los AL, en axón gigante de calamar y en nervios mielinizados de rana (Ragsdale et al. 1996) (Yarov-Yarovoy et al. 2001) (Lipicky, Gilbertt, and Stillmant 1972). A pesar de las estructuras diferentes de estos dos fármacos, es probable que exista una superposición en sus sitios de unión, ya que algunos residuos están implicados en la unión de ambos fármacos (Lipkind and Fozzard 2005). La fenitoína y la carbamazepina son inhibidores alostéricos del sitio receptor 2 de los canales de sodio y se unen preferiblemente al estado inactivado. También los antiarrítmicos de clase I inhiben los Nav, por despolarización y por mayores tasas de estimulación de la célula cardíaca (Catterall 1987).

4.2. Evolución de los Nav

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) pertenecen a una superfamilia que incluye los canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv), los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Cav) y los canales regulados por nucleótidos cíclicos (Jan et al. 1992). Tanto los Nav como los Cav están compuestos de cuatro dominios homólogos, mientras que los Kv y los canales regulados por nucleótidos cíclicos, están compuestos de un solo dominio cada uno, como se observa en la Fig. 9 (Strong, Chandy, and Gutman 1993).

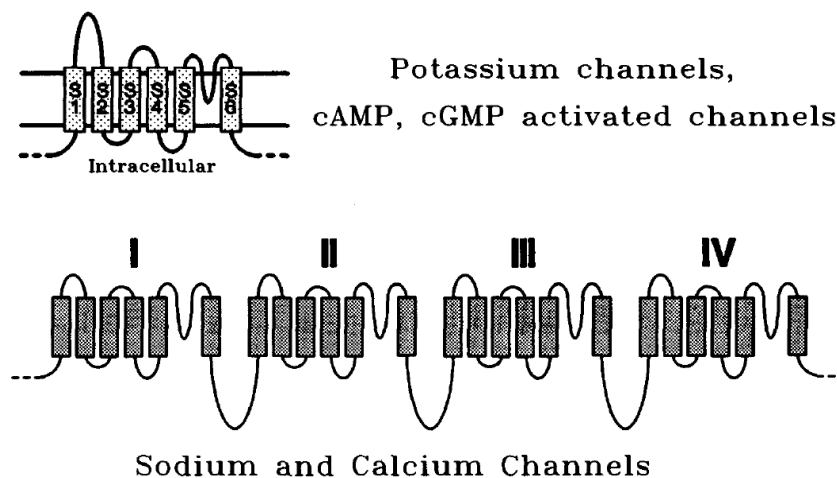


Fig. 9 Diagrama esquemático de la estructura de los canales iónicos. En la parte superior se muestra la estructura de los canales de K^+ y de los activados por nucleótidos cíclicos y en la parte inferior se muestra la estructura de los canales de Ca^{2+} y Na^+ (Strong, Chandy, and Gutman 1993).

Las bacterias como las células eucariotas tienen altas concentraciones de K^+ y bajas concentraciones de Ca^{2+} en el medio intracelular, muchas bacterias no tienen necesidad de Na^+ y Cl^- , esto hace que estos organismos generalmente no expresen canales de Na^+ o de Cl^- , mientras que si expresan canales de K^+ (Milkman 1994). Por lo tanto, se cree que los canales de Na^+ y los de Ca^{2+} evolucionaron a partir de un canal de K^+ de un solo dominio (B. Hille 1988). Igualmente es probable que los canales de Ca^{2+} hayan evolucionado a partir de los canales de K^+ , durante la evolución de las eucariotas (Bertil Hille 1989).

Los Nav como se había mencionado antes, comparten la misma estructura de cuatro dominios con los Cav, lo que ha llevado a sugerir que los Nav han evolucionado a partir de los Cav; se ha planteado que los Nav evolucionaron a partir de un canal ancestral parecido a los canales de Ca^{2+} tipo T (Spafford, Spencer, and Gallin 1999). La hipótesis predice la existencia de un canal ancestral de cuatro dominios con propiedades intermedias entre los canales de Ca^{2+} y los canales de Na^+ (Zhou et al. 2004).

Hille en 1989 planteó la hipótesis de que un gen de un canal ancestral de un solo dominio, dio lugar a los canales de Ca^{2+} por dos duplicaciones intragénicas y luego dio lugar a los canales de Na^+ por una divergencia adicional después de la duplicación de genes (Bertil Hille 1989). Tal como se observa en la **Fig. 10**, un gen de un solo dominio fue sometido a una duplicación interna, para crear una estructura de dos dominios, luego de la divergencia de los dos dominios, una segunda duplicación interna dio lugar a la estructura de cuatro dominios conocida actualmente (Strong, Chandy, and Gutman 1993).

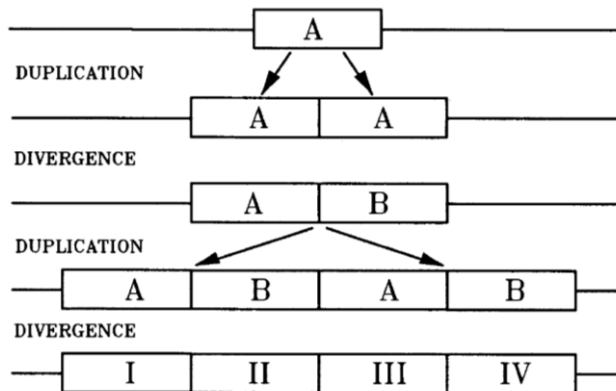


Fig. 10 Diagrama esquemático de las duplicaciones intragénicas que se presume dieron lugar a los genes de los canales de Ca^{2+} y Na^+ modernos. (Strong, Chandy, and Gutman 1993)

El grupo de Strong y colaboradores en 1993, llegaron a las mismas deducciones realizadas por Hille, al realizar árboles filogenéticos de alineamientos de secuencias de aminoácidos de cada uno de los dominios de algunos canales de Na^+ y de Ca^{2+} , encontrando que el tipo de topología usada coloca a los dominios I y III, por un lado y a los dominios II y IV por otro lado, en grupos monofiléticos, como se observa en la **Fig. 11**, razón por la cual estos dominios siguen siendo muy similares entre sí, como resultado de su historia evolutiva(Strong, Chandy, and Gutman 1993).

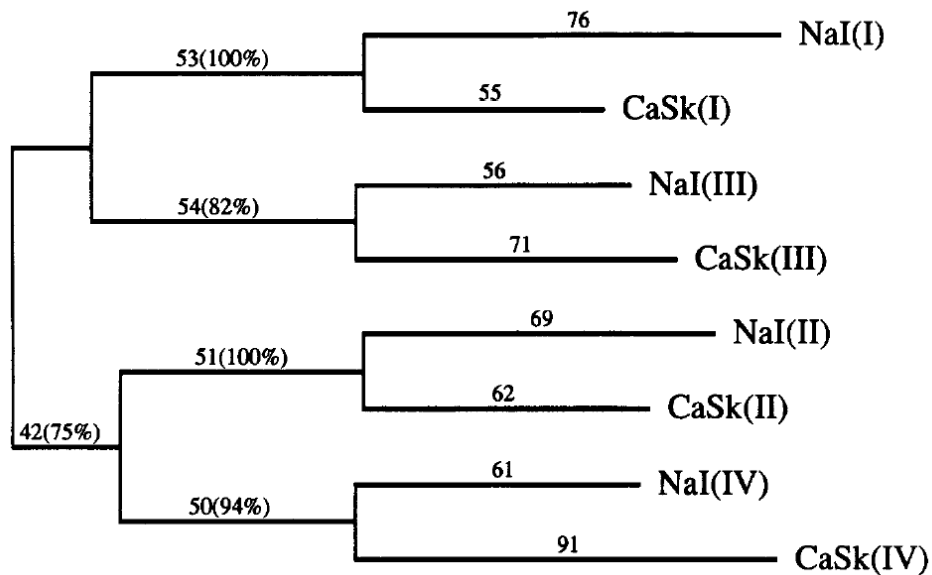


Fig. 11 Árbol filogenético por Máxima parsimonia, donde se muestra la relación entre los cuatro dominios de los canales NaI (canal de Na^+ de cerebro de rata) y CaSk (canal de Ca^{2+} de musculo esquelético de conejo). Entre paréntesis se observa el dominio de cada uno de los canales(Strong, Chandy, and Gutman 1993).

Por otro lado, los canales Nav de procariotas están compuestos de un solo dominio que contiene el módulo sensor de voltaje (entre los segmentos 1 y 4) y el módulo formador del poro (entre los segmentos 5 y 6), que se oligomeriza para formar un homotetrámero, lo que lo convierte en un canal más manejable para realizar el análisis estructural por medio de cristalografía de rayos X, que aquellos encontrados en eucariotas (Ren et al. 2001). Cada monómero de los Nav de procariotas es visto como análogo a los cuatro dominios de los Nav de eucariotas (Scheuer 2014)(Tang et al. 2014). Por esta razón las características estructurales y biofísicas de los Nav de procariotas han sido de gran interés para el estudio de este tipo de canales.

En el reino protista, específicamente en los coanoflagelados un pequeño grupo de gran importancia filogenética, debido a que se han considerado los parientes más próximos a los animales, también se ha identificado un gen homólogo a los Nav de los animales, el cual presenta un filtro de selectividad intermedio entre los Cav y Nav (Fig. 12)(Zakon 2012)(Vien and DeCaen 2016)(Liebeskind, Hillis, and Zakon 2011).

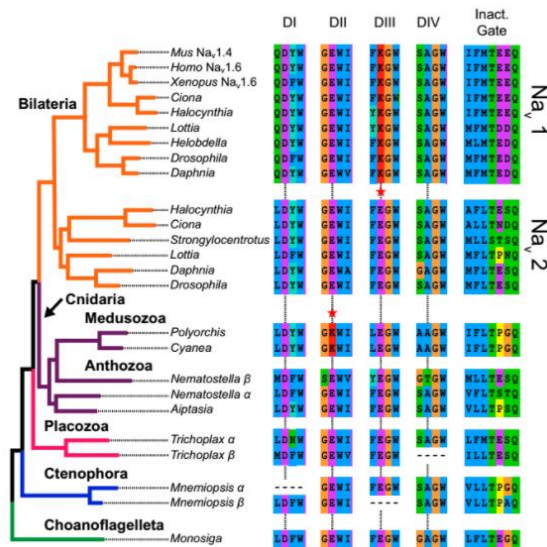


Fig. 12 Árbol filogenético por método de máxima verosimilitud de la familia de los canales Nav. (Liebeskind, Hillis, and Zakon 2011)

Los cnidarios son el primer filo del reino Animal, de los que se conocen que contienen células que producen potenciales de acción, llevados exclusivamente por iones de Na^+ . La evidencia esta soportada en la presencia de un canal de Na^+ en la medusa *Cyanea capillata* (Anderson, Holman, and Greenberg 1993). Igualmente se han reportado las secuencias de Nav de otros invertebrados como el de los moluscos *Aplisia californica*, *Loligo opalecens* y *Loligo Bleekereri*, aisladas de neuronas del sistema ganglionar nervioso; de los insectos *Drosophila melanogaster*, *Blatella germanica*, *Musca domestica* se han reportado dos Nav, encontrados en sistema nervioso; en los anélidos como la sanguijuela se han encontrado cuatro Nav, no se conoce sus sitios de expresión pero se creen que podrían estar en el sistema nervioso(Goldin 2002). Los reportes de las secuencias de aminoácidos de la subunidad α del canal de Na^+ de los invertebrados, se listan en la **Tabla 3**.

Tabla 3 Secuencias reportadas de Nav de invertebrados. (Goldin 2002)

Invertebrates						
AcNav1	SCAP1	<i>Aplysia californica</i>	California sea hare	1993	U66915	Dyer et al. (1997)
ApNav1	AnemNa1	<i>Aiptasia pallida</i>	Sea anemone	1810	AF041851	see Spafford et al. (1998)
BcNav1	BdNa1	<i>Bdelloura candida</i>	Turbellarian flatworm	1699	U93074	Jeziorski et al. (1997)
BgNav1	CSMA para	<i>Blattella germanica</i>	German cockroach	2031	Partial U73583 U71083	Dong (1997; Miyazaki et al. (1996)
BgNav2	Bsc1	<i>Blattella germanica</i>	German cockroach	2304	AF312365	Liu et al. (2001a)
CeNav1	CYNA1	<i>Cyanea capillata</i>	Scyphozoan jellyfish	1739	L15445	Anderson et al. (1993)
DmNav1	Para	<i>Drosophila melanogaster</i>	Fruit fly	1820	M32078-80	Ramaswami and Tanouye (1989); Loughney et al. (1989)
DmNav2	DSC1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Fruit fly	Partial	X14394-8	Salkoff et al. (1987)
HmNav1	LeNa1	<i>Hirudo medicinalis</i>	Leech	Partial		Blackshaw et al. (1999)
HmNav2	LeNa2	<i>Hirudo medicinalis</i>	Leech	Partial		Blackshaw et al. (1999)
HmNav3	LeNa3	<i>Hirudo medicinalis</i>	Leech	Partial		Blackshaw et al. (1999)
HmNav4	LeNa4	<i>Hirudo medicinalis</i>	Leech	Partial		Blackshaw et al. (1999)
HrNav1	TuNa1	<i>Halocynthia roretzi</i>	Ascidian tunicate	2049	D17311	Okamura et al. (1994)
HrNav2	TuNa2	<i>Halocynthia roretzi</i>	Ascidian tunicate	2221	AB042806	Nagahora et al. (2000)
LbNav1	squid Na channel	<i>Loligo bleekeri</i>	Squid	1522	D14525	Sato and Matsumoto (1992)
LoNav1	GFLN1	<i>Loligo opalescens</i>	Squid	1784	L19979	Rosenthal and Gilly (1993)
MdNav1	Msc Vssc1	<i>Musca domestica</i>	House fly	2108	X96668 U38814	Williamson et al. (1996); Ingles et al. (1996)
PpNav1	PpSCN1	<i>Polyorchis penicillatus</i>	Hydrozoan jellyfish	1695	AF047380	Spafford et al. (1998)

En los vertebrados se han reportado las secuencias de Nav de algunos peces como pez eléctrico *Sternopygus macrurus* y el pez cebra *Danio rerio*, en estos organismos se han obtenido seis Nav's. Se han reportado solo secuencias parciales de músculo esquelético y corazón de algunos anfibios y reptiles. Mientras que se cuentan con las secuencias completas de humano, ratón y rata, lo que ha permitido establecer que existen diez canales Nav(Goldin 2002).

El énfasis reciente del estudio de los Nav se ha enfocado en la determinación de la estructura tridimensional, en los mecanismos de su función, en su interacción con otras estructuras, en su modulación y en las patologías asociadas con mutaciones puntuales. Los progresos en la bioquímica de estos canales han permitido su marcación con toxinas, su solubilización y su purificación. A la fecha cinco estructuras de Nav de procariotas han sido resueltas por medio de cristalografía de rayos X, de las cuales tres son de longitud completa (Payandeh et al. 2012)(Payandeh et al. 2011)(Tsai et al. 2013)(X. Zhang et al. 2012) y dos solo de la región del poro(Mccusker et al. 2012)(Shaya et al. 2014). Mientras que se han dilucidado solo dos estructuras de Nav por medio de criomicroscopía electrónica en eucariotas; una de la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*) (Sato et al. 2001) y la otra de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) (Shen et al. 2017).

En general las secuencias de la familia de los Nav están altamente conservados y especialmente en los segmentos transmembrana, lo que es evidenciable al alinear las secuencias de los diferentes canales. Esta conservación genética es coherente desde el mundo de vista evolutivo ya que de estos canales depende la función de los sistemas excitables (B. Hille 2001).

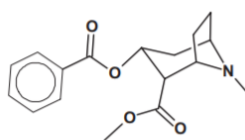
4.3. Estructura, función y sitio receptor de AL

4.3.1. Estructura y función de los AL

Los AL han sido usados en terapéutica para bloquear la percepción sensorial, permitiendo de esta manera llevar a cabo procedimientos quirúrgicos en tejidos periféricos, con el fin de revertir el dolor agudo o tratar el dolor crónico. Los AL bloquean de manera reversible la conducción nerviosa, mostrando su efecto en cualquier membrana excitable; actúan evitando la propagación de los potenciales de acción en las fibras nerviosas, por medio del bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje; sin embargo, se conoce que estas moléculas también bloquean algunos canales de potasio y calcio (Bagal et al. 2012) (Smerilli and Sacot 2004).

La anestesia local fue introducida hace aproximadamente 132 años, gracias a los trabajos realizados por Sigmund Freud y Karl Köller. Sigmund Freud fue el primero en proponer el uso de la cocaína (alcaloide aislado de las hojas de *Erythroxylon coca* inicialmente por Gaedicke en 1855 en forma de cristales rojizos y nombrado como eritroxilina y luego por Niemann en 1860 quien produjo cristales blancos puros (Wildsmith 1985)) como anestésico local en el ámbito clínico y su colega y amigo Karl Köller descubrió el potencial de la cocaína como anestésico local, al agregar una gota de este alcaloide disuelto en agua destilada en el ojo de una rana y observar que al anfibio permitía que le tocaran la córnea sin presenta reacción reflexiva o defensiva (Dos Reis 2009).

En el ámbito clínico, la cocaína fue ampliamente usada a pesar de sus desventajas de alta toxicidad, corta duración del efecto anestésico, imposibilidad de esterilización de la solución y costos; además que el abuso de esta sustancia produce adicción. Estudios posteriores realizados por Alfred Einhorn, demostraron que la capacidad anestésica de la cocaína se debía a un grupo ácido, siendo el más potente el grupo bencilo (Scholz 2002), en la **Fig. 13**, se muestra la estructura química de la cocaína. Gracias a estos hallazgos y la preocupación por la toxicidad producida por la cocaína, tanto la comunidad médica como la industria farmacéutica se han concentrado en la búsqueda y desarrollo de nuevos anestésicos locales menos tóxicos (Ruetsch, Boni, and Borgeat 2001).



Cocaine

Fig. 13 Estructura química de la cocaína. (Bruhova, Tikhonov, and Zhorov 2008)

En 1898 se sintetizó el primer anestésico local tipo aminoamida, conocido como nirvaquina, sin embargo, su uso se detuvo por ser una sustancia irritante. En 1900 y en 1905 se desarrollaron la benzocaína y la procaína respectivamente, anestésicos locales tipo aminoéster; en 1930 la tetracaína fue el último anestésico local tipo éster desarrollado y en 1944 se introdujo la lidocaína, primer anestésico local tipo amida usado a nivel clínico en 1948. Desde la aparición de la lidocaína se han venido desarrollando otros anestésicos locales tipo amida, como la mepivacaína, la prilocaína. La aparición de la bupivacaína en 1963 fue un paso muy importante en la evolución de la anestesia regional, por ser el primer fármaco tipo amida de acción prolongada, y el siguiente anestésico local de larga duración introducido fue la etidocaína en 1972 (Ruetsch, Boni, and Borgeat 2001).

La mayoría de los AL presentan una estructura en común, que consta de un anillo aromático hidrofóbico; una cadena hidrocarbonada intermedia cuyo enlace puede ser de tipo éster o amida y de una amina terminal (Fozzard, Lee, and Lipkind 2005), como se observa en la Fig. 14.

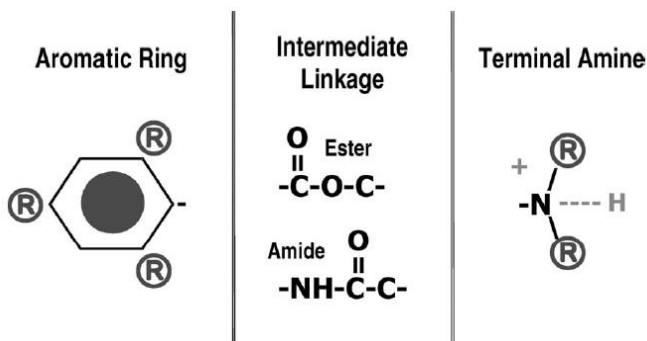


Fig. 14 Componentes estructurales de los anestésicos locales. (Becker and Reed 2006)

El anillo aromático favorece la solubilidad lipídica, propiedad relacionada con la potencia de la molécula, facilitando la difusión a través de membranas celulares; la amina terminal puede existir en forma terciaria (3 enlaces) la cual es soluble en lípidos o en forma cuaternaria (4 enlaces), con carga positiva que hace que la molécula sea soluble en agua. El anillo aromático determina el grado de solubilidad lipídica pero la amina terminal actúa como un interruptor on/off que permite que el AL exista en una conformación soluble en agua o soluble en lípidos; para que la base del AL sea estable en solución se formula como una sal clorhidrato, de esta manera las moléculas existen en estado cuaternario en el momento de la inyección y son incapaces de penetrar la membrana.

El tiempo de inicio de la anestesia local se basa en la proporción de moléculas que se convierten a la estructura terciaria cuando se exponen al pH fisiológico (7,4), esta proporción se determina por la constante de ionización pKa, que se calcula por medio de la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\log \left(\frac{\text{cationic form}}{\text{uncharged form}} \right) = pKa - pH$$

Es decir, si un AL tiene un pKa de 7,4 y se inyecta en tejidos con pH fisiológico de 7,4, el 50% de las moléculas existirían en forma cuaternaria y el 50% en forma terciaria, lo que significa que solo la mitad de las moléculas puede ser solubles en lípidos y penetrar la membrana. Sin embargo, el pKa de los AL es mayor a 7,4 por lo tanto hay una mayor proporción de moléculas que existen en estado cuaternario, cuando son inyectadas a un tejido normal. De esta manera, por ejemplo, la bupivacaína (pKa 8,1) sería menos efectiva que la mepivacaína (pKa 7,6). Sin embargo, una vez las moléculas en estado terciario entren a la membrana, se reionizan a su estado cuaternario y es a lo que se le atribuye el bloqueo real del canal de sodio(Becker and Reed 2012), tal como se ilustra en la **Fig. 15**.

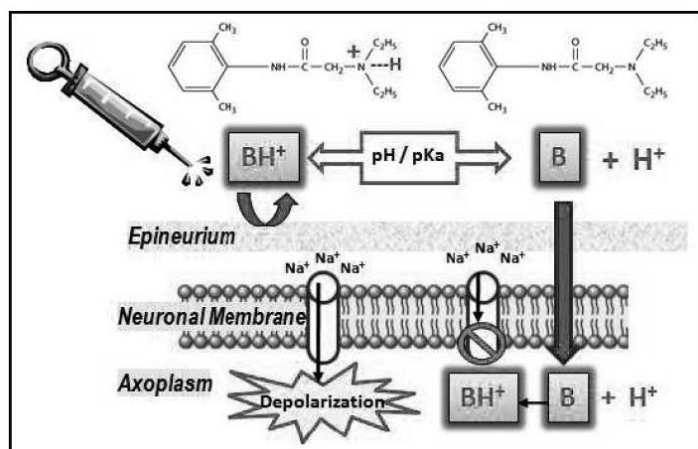


Fig. 15 Acción de los anestésicos locales. (Becker and Reed 2012)

Por su parte la cadena intermedia determina el patrón de biotransformación, los ésteres son hidrolizados por esterasas plasmáticas, mientras que las amidas son biotransformadas en el hígado (Becker and Reed 2006). En la Fig. 16 se muestra la estructura de algunos AL.

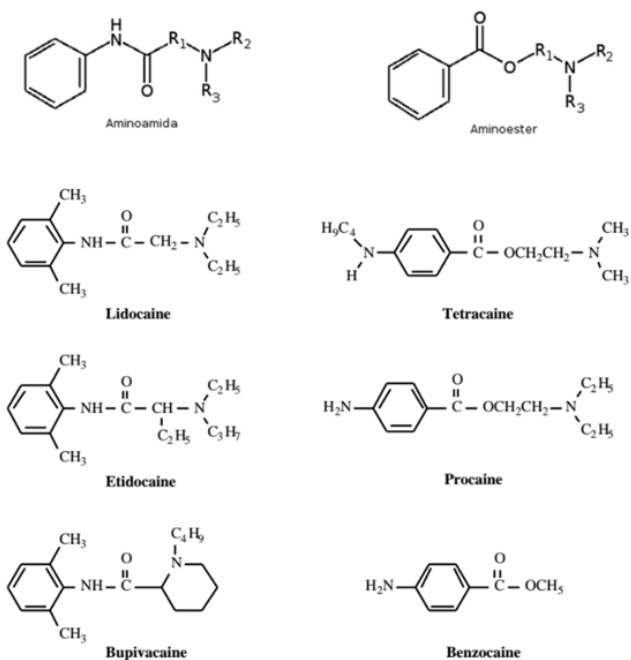


Fig. 16 Estructura química de algunos anestésicos locales. (Fozzard, Lee, and Lipkind 2005)

Como se observa en la **Fig. 16**, la benzocaína usada como anestésico tópico, difiere de los otros anestésicos locales usados a nivel clínico, al no presentar amina terciaria, sin embargo, se sugiere que la benzocaína comparte el mismo sitio de unión con los otros anestésicos locales, al menos en canales de Na^+ musculares y neuronales (Schmidt Mayer and Ulbricht 1980).

Las aminas cuaternarias no son usadas a nivel clínico, pero se utilizan en investigación; un ejemplo es el QX-314 (**Fig. 17**), derivado cuaternario de la lidocaína, con carga positiva permanente, que se utiliza en investigación para ayudar a elucidar el mecanismo de bloqueo de los canales de sodio. Este fármaco bloquea los Nav solo cuando se aplica en su lado intracelular (Frazier, Narahashi, and Yamada 1970).

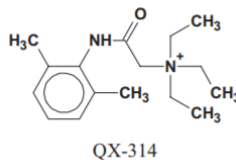


Fig. 17 Estructura química de QX-314. (Bruhova, Tikhonov, and Zhorov 2008)

Estudios han sugerido que los AL con estructura tipo éster presentan una acción más potente que aquellos con estructura amida (Scholz 2002). Courtney y Strichartz revisaron los elementos estructurales que determinan la actividad de los AL y encontraron que la presencia del grupo metilo en los carbonos 2 y 6 del anillo aromático, sustituyentes alifáticos en el grupo amina y cadenas cortas intermedias, mejoran la actividad de los AL (Fozzard, Lee, and Lipkind 2005).

Actualmente los AL más usados a nivel clínico son lidocaína, tetracaína y bupivacaína. A nivel farmacológico la bupivacaína, es entre tres y cuatro veces más potente que la lidocaína. En seres humanos, el efecto anestésico de la bupivacaína está reportado como los de mayor duración (más de 90 minutos), en contraste con la lidocaína con una duración mucho menor (menos de 30 minutos) (Smerilli and Sacot 2004).

Los AL también pueden afectar los canales de potasio (K^+) y los canales de calcio (Ca^{2+}), lo que podría ayudar a explicar algunos de sus efectos secundarios (Scholz 2002).

Los Kv y no dependientes de voltaje también son bloqueados por AL, sin embargo los canales de K^+ presentan una menor afinidad por los AL que los canales de Na^+ , por ejemplo la afinidad por bupivacaina es de 4 a 10 veces menor y para lidocaína es de 10 a 80 veces menor(Brau, Vogel, and Hempelmann 1998)(Komai and McDowell 2001). Los canales de K^+ no dependientes de voltaje son bloqueados por AL en neuronas sensoriales, como es el caso del canal de K^+ “flicker” el cual se encuentra en fibras mielinizadas del nervio ciático de rana, se encontró que es altamente sensible a los AL, requiriendo solo 0,21 μM de bupivacaina para la mitad del bloqueo máximo(Brau et al. 1995). También los canales de K^+ sensibles a ATP en músculo cardíaco son sensibles a lidocaína y bupivacaina(Olschewski et al. 1996)(Olschewski et al. 1999).

El bloqueo de los AL a los Kv puede explicar los efectos secundarios y tóxicos de los AL en órganos distintos del sistema nervioso periférico, especialmente si presentan diferentes sensibilidades(Scholz 2002).

Debido a que la estructura de los canales de Ca^{2+} es muy parecida a los canales de Na^+ , no es sorprendente que las corrientes de Ca^{2+} , especialmente en neuronas de ganglios de la raíz dorsal (DRG), sean bloqueadas por diferentes tipos de AL, como tetracaína, bupivacaina, procaína y lidocaína(Sugiyama and Muteki 1994)(Z. Xiong and Strichartz 1998).

4.3.2. Sitio receptor de anestésicos locales

Los mecanismos moleculares por los cuales los anestésicos locales (AL) alteran la función de los canales de sodio no está del todo clara. Sin embargo, con el conocimiento de la estructura molecular de los canales de Na^+ , especialmente de la subunidad α formadora del poro, ha sido posible acercarse al sitio receptor de AL(Scholz 2002).

Cálculos biofísicos basados en el campo eléctrico a través de la membrana celular, sugieren que el sitio de unión de los AL se encuentra a una distancia de la superficie externa de la membrana de aproximadamente 60% del diámetro de la membrana, es decir el sitio receptor posiblemente se encuentra protegido en el poro y para lograr el bloqueo se necesita la apertura del canal (Scholz 2002). También se ha observado que la unión de estos fármacos es acumulativa y que el bloqueo funciona cuando los canales están abiertos, esto ha sido llamado bloqueo dependiente del uso(Ulbricht 1981)(Courtney 1975).

El grupo de Ragsdale en 1994 realizaron mutagénesis sitio dirigidas para examinar la función del segmento transmembrana S6 del dominio IV en la acción de los AL y encontraron que los residuos en las posiciones F1764 y Y1771 del canal de sodio de cerebro de rata Nav1.2 son determinantes en el sitio de unión de AL, y la sustitución de estos residuos con Alanina (A) desestabiliza la unión de estos fármacos por reducción de hidrofobicidad y aromaticidad en estas posiciones, también encontraron que I1760 orientado en el mismo lado de F1764 y Y1771 (**Fig. 18**), se encuentra bien posicionado para el acceso extracelular al sitio de unión de los AL. El reemplazo del residuo voluminoso Isoleucina (I) por Alanina (A) permitió que QX314 alcanzara el sitio de unión a través del medio extracelular, tal vez pasando directamente a través del poro desde el exterior, de esta manera I1760 corresponde probablemente a una región estrecha del poro(Ragsdale et al. 1994).

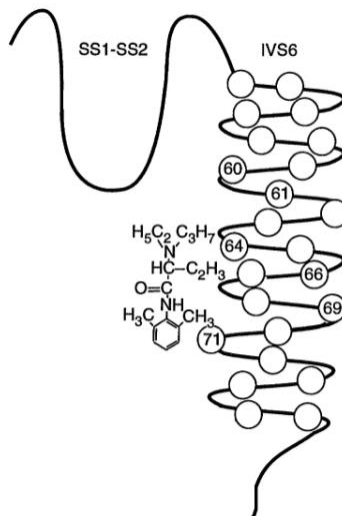


Fig. 18 Residuos en el IVS6 importantes en la unión de AL. (Ragsdale et al. 1994)

Debido a que los AL se unen en una cavidad en el poro formada por un arreglo simétrico de los segmentos S6 de cada uno de los cuatro dominios, es probable que los segmentos S6 en los dominios I, II y III también contribuyan al sitio receptor de AL(Yarov-Yarovoy et al. 2001).

Mutaciones en los residuos del segmento S6 del dominio III de Nav1.2 han sido estudiadas por el grupo de Yarov-Yarovoy en 2001, encontraron que solo tres mutaciones presentan efectos fuertes en el bloqueo por AL. Mutaciones de los residuos L1465A y I1469A que se encuentran en el mismo lado de la hélice α (**Fig. 19**), disminuyen el bloqueo por

lamotrigina (medicamento utilizado para la epilepsia y el trastorno bipolar, antagonista de los Nav) y etidocaína en el estado inactivado y la mutación del residuo N1466A también disminuye el bloqueo en estado inactivado por el compuesto 4030w92 (anticonvulsivante, antagonista de los Nav) y tiene un efecto fuerte en el bloqueo por etidocaína (Yarov-Yarovoy et al. 2001).

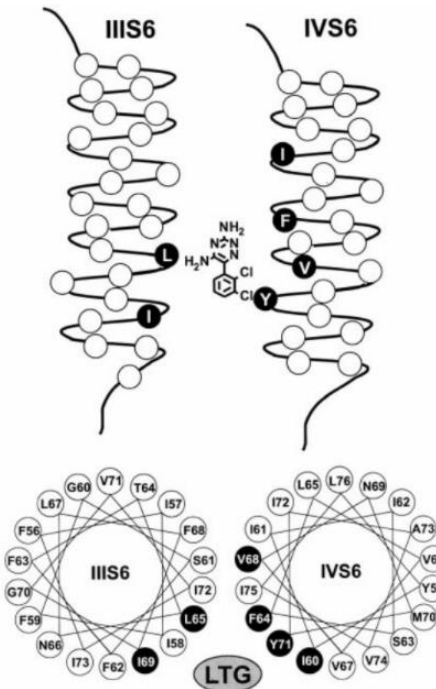


Fig. 19 Unión de lamotrigina al segmento IIIIS6 y IVS6 del canal de sodio de cerebro de rata. (Yarov-Yarovoy et al. 2001)

En el año 2002 el grupo de Yarov-Yarovoy evaluaron la función del segmento transmembrana S6 del dominio I y II del canal Nav1.2 de rata en la unión de AL; encontraron que solo una mutación I409A en el segmento IS6 disminuye el bloqueo en estado inactivado por etidocaína y que este residuo junto con los residuos mencionados anteriormente en los segmentos IIIIS6 y IVS6 son importantes para la unión de AL (**Fig. 20**). También encontraron que las mutaciones de los residuos N418 y I409 por Alanina (A) en el segmento IS6, disminuían el bloqueo dependiente del uso por etidocaína. Ninguna de las mutaciones estudiadas del segmento IIS6 tuvieron un efecto significativo sobre la afinidad de unión de etidocaína hacia el estado inactivado o efecto sobre el bloqueo dependiente del uso de este fármaco (Yarov-Yarovoy, McPhee, and Idsvoog 2002).

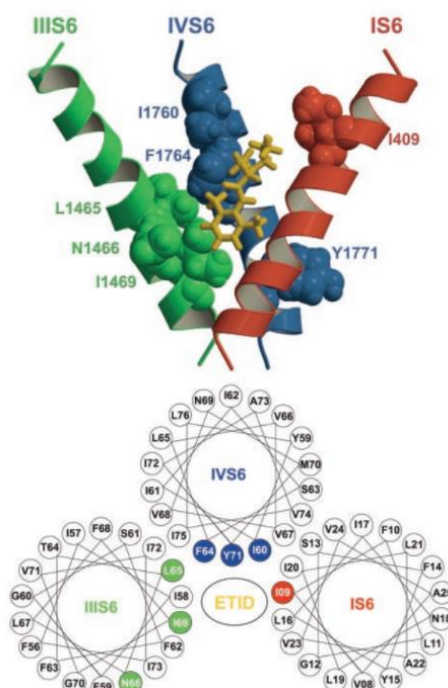


Fig. 20 Unión de etidocaína al segmento IS6, IIS6 y IVS6 del canal de sodio de cerebro de rata. (Yarov-Yarovoy, McPhee, and Idsvoog 2002)

En el año 2003 también se evaluó la función de los residuos en el segmento IS6 y IIS6 en el bloqueo de AL, usando mutagénesis por escaneo de Cisteína (C) del canal de Nav1.4 de rata y encontraron que los residuos I424, I425 y G428 del segmento IS6 y los residuos I782 y V786 del segmento IIS6 son determinantes en la unión de lidocaína. Además proponen una relación topológica de los residuos importantes en la unión de AL de los segmentos S6 del canal de Na^+ , la cual se puede observar en la **Fig. 21**(Kondratiev and Tomaselli 2003).

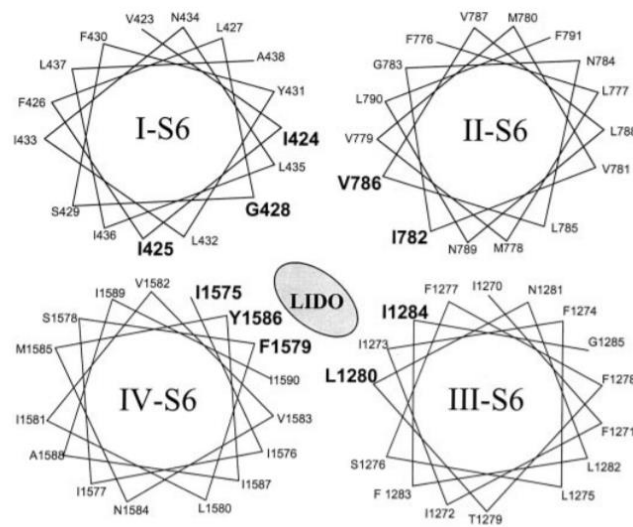


Fig. 21 Representación de los segmentos S6 de los cuatro dominios. En negrita se muestran los residuos que alteran la unión de la lidocaína (Kondratiev and Tomaselli 2003).

Aunque el sitio de unión de BTX se encuentre en la parte exterior del poro, parece influir en la potencia de unión de AL en las regiones internas del poro. La BTX altera la apertura de los canales Nav y hace que estos canales se abran de forma persistente, mientras que los AL bloquean la conductancia del Na⁺ (Scholz 2002)(S.-Y. Wang, Nau, and Wang 2000).

La unión de BTX y AL es dependiente del estado, los AL se unen preferiblemente al estado inactivado mientras que la BTX se une a su sitio receptor cuando el canal está abierto(B. Hille 2001). Los AL son antagonistas de la BTX, este antagonismo se sugiere que es debido a una interacción alostérica indirecta de estos dos ligandos(S.-Y. Wang, Nau, and Wang 2000).

Los receptores de BTX y AL han sido mapeados en residuos comunes del segmento transmembrana S6 del dominio I, III y IV de la subunidad α del canal de Na⁺(S.-Y. Wang, Nau, and Wang 2000).

Mutagenesis sitio dirigida en el segmento transmembrana S6 del dominio I del canal de Na^+ de músculo esquelético de rata mostró que el reemplazo de los residuos N434 (N418 en Nav1.2) y L437 por Lisina (K), reduce significativamente la potencia por etidocaína en estos canales de Nav mutantes, que han sido reportados ser completamente resistentes a BTX (S. Wang and Wang 1998). Esta reducción en la potencia de etidocaína ocurre tanto en estado en reposo como en estado inactivado de estos canales mutantes. De igual manera se sugiere que la carga positiva dada por la Lisina (K) puede interrumpir en la unión normal de los fármacos. Estos resultados demuestran que los residuos relacionados con el sitio de unión de BTX pueden influir en la afinidad de unión de los AL (**Fig. 22**)(G. Wang, Quan, and Wang 1998). En otro estudio demostraron que en los canales de Na^+ en estado inactivado, esta misma mutación en el residuo N434, causaba una disminución de la potencia de los anestésicos locales bupivacaina y cocaína(Nau et al. 1999).

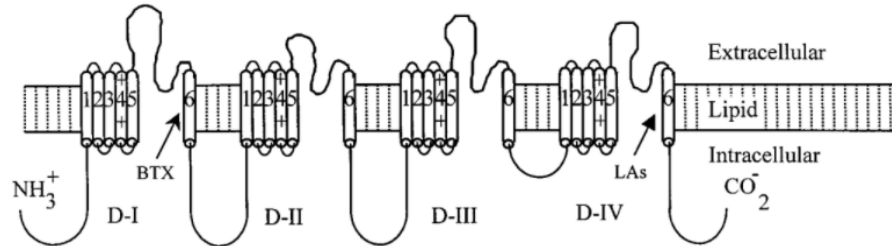


Fig. 22 Subunidad α del canal de Na^+ , donde se muestra los sitios de unión de BTX y AL. (G. Wang, Quan, and Wang 1998)

En el año 2000, el grupo de Wang evaluó si los residuos F1274 hasta el N1281, ubicados en la mitad del segmento DIIS6 del canal de Na^+ de músculo de rata, estaban involucrados en la unión de BTX y AL; realizaron sustitución por Lisina (K), de cada uno de estos residuos. Encontraron que dos mutantes S1276 y L1280 (L1465 en Nav1.2) al expresarlos en células de mamíferos eran completamente resistentes a 5mM de BTX durante pulsos repetitivos. Estos mutantes también mostraron una reducción de afinidad de 10 a 20 veces por la bupivacaina, en estado inactivado. Con estos resultados concluyeron que tanto el residuo S1276 como el L1280 son críticos para la unión de BTX y AL y además interactúan con los otros residuos reportados como importantes en la unión de estos dos compuestos en los segmentos DIS6 y DIVS6(S.-Y. Wang, Nau, and Wang 2000).

Los residuos mencionados anteriormente como importantes en la unión de AL (I1760, F1764 y Y1771) ubicados en el segmento IVS6, fueron nuevamente evaluados para determinar si también se encontraban implicados en la unión de BTX; los resultados mostraron que el residuo F1764 es esencial para la unión de la BTX y que el residuo I1760 juega también un papel importante en la interacción; mientras que la mutación en el residuo Y1771A no era importante en la unión de BTX (**Fig. 23**)(Linford et al. 1998)

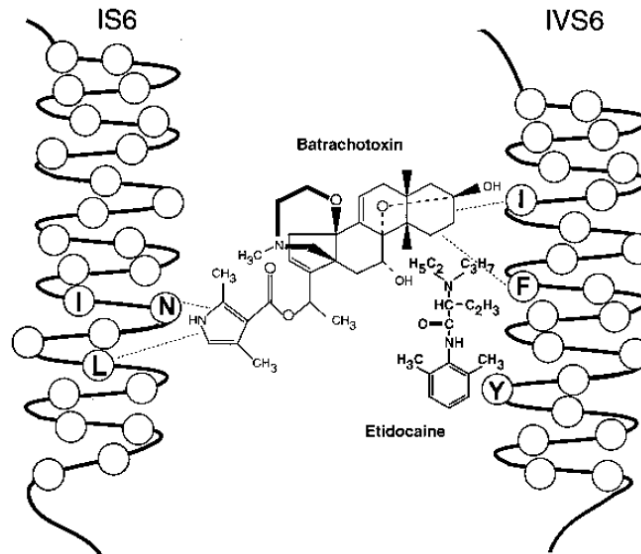


Fig. 23 Modelo de unión de la BTX al segmento IS6 y IVS6 del canal de Na⁺ de cerebro de rata.
(Linford et al. 1998)

Igualmente se demostró que la sustitución con Lisina (K) de los residuos ubicados en el segmento IVS6 del canal de Na⁺ de músculo de rata, F1579 (F1764 en Nav1.2), implicado en la reducción de la unión a AL y del residuo N1584, implicado en un aumento drástico de la unión a AL, son resistentes al alcaloide BTX. Proponen que la apertura del canal promueve una mejor exposición a los sitios de unión de BTX y AL(S.-Y. Wang and Wang 1999).

Lo anterior demuestra que existen dos residuos en la mitad del segmento DIS6, dos residuos en el segmento DIIS6 y tres residuos en el segmento DIVS6, críticos en la unión de BTX y AL (Fig. 24).

$\mu 1$ Na ⁺ channel	Position	1	5	10	15	20	25
D1	-----S6 segment	YMIFF	VVIIF	LGSFY	LINLI	LAVVA	MAY--
D2	-----S6 segment	CLTVF	LMVMV	IGNLV	VLNLF	LALLL	SSF--
D3	-----S6 segment	MYLYF	VIFII	FGSFF	TLNLF	IGVII	DNF--
D4	-----S6 segment	GICFF	CSYII	ISFLI	VNMY	IAIIL	ENF--
		1	5	10	15	20	25

Fig. 24 Secuencia de aminoácidos del segmento transmembrana S6 en los dominios DI–DIV del canal de Na⁺ de músculo de rata. Residuos críticos en la unión de BTX se encuentran en negrita. Residuos críticos en la unión de AL se encuentran subrayados. Existen siete residuos críticos en la unión de BTX y AL (S.-Y. Wang, Barile, and Wang 2001).

De la misma manera se han realizado estudios evaluando la función del filtro de selectividad (DEKA) en la unión a AL, en el canal de Na⁺ de musculo esquelético de rata. Encontraron que la sustitución por Alanina (A) en el residuo E755 del dominio II y la sustitución por Glutamato (E) en el residuo K1237 del dominio III, aumentaban la afinidad por lidocaína dos y cuatro veces respectivamente. Al ser el residuo K1237E el que presenta mayor afinidad, evaluaron su efecto al realizar el reemplazo con otros aminoácidos y los resultados sugieren que la Lisina (K) en la posición 1237 influencia en la unión de lidocaína por una interacción electrostática con la parte hidrofílica de este AL. Mutaciones en los otros residuos que conforman el filtro de selectividad, D400A en el dominio I, E755A en el dominio II y A1529D en el dominio IV, permiten el bloqueo por los derivados de lidocaína (QX314 y QX222) al aplicarlos externamente. Los resultados demuestran que el filtro de selectividad del canal de Na⁺ se encuentra cerca del sitio receptor de anestésicos locales antiarrítmicos y que afecta el acceso a estos fármacos y su disociación(Sunami, Dudley, and Fozzard 1997).

Se sugiere que los AL se unen preferiblemente al estado inactivado o activado del canal de Na⁺ y adicionalmente estabilizan este estado(Z. Chen et al. 2000). Sin embargo, varios AL como etidocaína, cocaína y cocaetileno (compuesto formado por el hígado cuando cocaína y etanol coexisten en el torrente sanguíneo) bloquean el canal de Na⁺ en estado cerrado (reposo). Dos hipótesis han sido propuestas para explicar estos efectos; de acuerdo con la hipótesis de “receptor modulado” (B. Hille 1977), los AL se pueden unir al estado cerrado, abierto o inactivado pero con diferente afinidad y de acuerdo con la hipótesis de “receptor protegido” (Starmer, Grant, and Strauss 1984), los AL tienen una afinidad permanente a su receptor, mientras que el bloqueo depende de la frecuencia y

duración de la apertura o cierre del canal, que impone una barrera de energía para el ingreso y salida del ligando (Bruhova, Tikhonov, and Zhorov 2008)

4.4. Ranas de la familia Dendrobatidae y su importancia como modelos para mapear el sitio receptor de anestésicos locales

Los dendrobátidos son una familia de anuros, que se conocen como ranas venenosas de dardo. Se encuentran dentro de la superfamilia Dendrobatoidea. Se conocen a la fecha 184 especies, agrupadas en 10 géneros, según el “Amphibian Species of the World” (Frost 2016). Las 184 especies están clasificadas en tres subfamilias: Colostethinae, Hyloxalinae y Dendrobatinae, tal como se muestra en la **Fig. 25** (Grant et al. 2006).

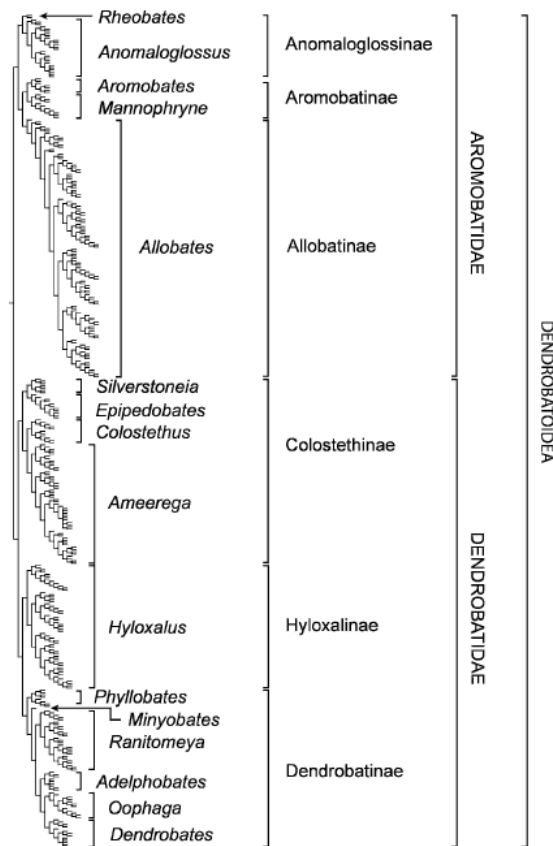


Fig. 25 Taxonomía propuesta de la superfamilia Dendrobatoidea. (Grant et al. 2006)

Las especies de dendrobátidos habitan arroyos, bosques densos, bosques lluviosos, páramos y hábitats terrestres, acuáticos y arbóreos; desde Nicaragua hasta Bolivia y el bosque Atlántico de Brasil y desde la costa Pacífica de Suramérica hasta Martinica en las Antillas Francesas(Grant et al. 2006).

Se han detectado cerca de 500 alcaloides lipofílicos en el veneno secretado por estas ranas(JW. Daly, Spande, and Garraffo 2005)(JW. Daly, Myers, and Whittaker 1987)(JW. Daly et al. 2002), actualmente se siguen descubriendo nuevos alcaloides. Un alcaloide se define como un compuesto cíclico que contiene al menos un nitrógeno en su anillo, se caracterizan porque a muy bajas concentraciones actúan como toxinas, antibióticos o repelentes que permiten al organismo productor sobrevivir ante fenómenos de competencia, herbivoría y depredación. Su acción se fundamenta en interactuar de forma específica con enzimas y proteínas de otros organismos, modificándolas alostéricamente y alterando su función vital(Cuendet and Pezzuto 2007). Entre los alcaloides presentes en esta familia de anuros, se han numerado unos como los alcaloides principales ya que son los de más actividad o mayor presencia y entre estos están: las BTX's, la epibatidina, las histrionicotoxinas (HTX's) y las pumiliotoxinas (PTX's)(JW. Daly, Spande, and Garraffo 2005).

La coloración aposemática que presentan estas ranas, mezcla patrones y colores según la especie (rojo, azul amarillo y naranja), y es considerada como una señal visual de advertencia para posibles depredadores. Se ha descubierto una correlación entre el aposematismo y la capacidad para almacenar potentes toxinas en su piel, como estrategia defensiva contra depredadores y agresores potenciales(Summers and Clough 2001).

Las ranas, secretan las toxinas por la piel cuando son atrapadas por el depredador, estas se absorben a través del epitelio bucal o conjuntivo, pasan al sistema circulatorio, y luego, al sistema nervioso, llegando a producir modificaciones en este sistema, parálisis, y muerte(C. . Myers, Daly, and Malkin B 1978). Los indígenas del Chocó biogeográfico desde tiempos precolombinos ya conocían que estas ranas desprendían una secreción tóxica, la cual utilizaban para untar en las puntas de los dardos de cerbatana, usados para cazar diversos vertebrados (especialmente mamíferos y aves) como fuente proteica para su alimentación; estos animales morían presentando contracturas rígidas y generalizadas en sus músculos esqueléticos(Burrowes and Myers 1987).

Entre los alcaloides encontrados en esta familia de anuros, se encuentra la BTX, la cual ha demostrado ser activador selectivo, casi irreversible de los canales de sodio responsable de la conducción nerviosa y la contracción muscular; previene la inactivación de los

canales de sodio, produciendo parálisis. Este alcaloide ha permitido entender la actividad de los canales de sodio y su interacción con AL, anticonvulsivantes, antiarrítmicos y otros tipos fármacos(Albuquerque, Daly, and Witkop 1971).

Se han descrito tres especies del género *Phyllobates* (*Phyllobates aurotaenia*, *P. bicolor* y *P. terribilis*), distribuidas en el chocó biogeográfico colombiano que presentan niveles elevados de este alcaloide(Kahn et al. 2016), sin embargo, los niveles difieren entre las especies, siendo *Phyllobates terribilis* la que presenta mayor cantidad de BTX, hasta 500 µg por rana(JW. Daly, Myers, and Whittaker 1987).

Inicialmente se creía que la BTX era producida por las ranas, pero la evidencia indica que los alcaloides encontrados en las pieles de estos anuros sugiere que su presencia se asocia a un mecanismo de defensa exógeno, adquirido a través de la dieta basada en hormigas y otros pequeños artrópodos que contienen el alcaloide mencionado o sus precursores(JW. Daly, Secunda, et al. 1994)(JW. Daly, Martin Garraffo, et al. 1994)(Darst et al. 2005). La BTX también se ha reportado en dos géneros de aves de Nueva Guinea (*Ifrita* y *Pitohui*)(Dumbacher et al. 1992)(Dumbacher, Spande, and Daly 2000) y en un escarabajo aposemático de la familia Melyridae, el cual sirve de alimento para las aves de los dos géneros reportados anteriormente(Dumbacher et al. 2004).

Existe evidencia que indica que los Nav de *Phyllobates* son insensibles o resistentes a este alcaloide, como lo demostró el grupo de Albuquerque y colaboradores en 1973, sus resultados mostraron que la membrana del nervio ciático y del músculo sartorio de la rana *Phyllobates aurotaenia* son resistentes a los efectos despolarizantes de BTX, incluso a concentraciones tan altas como 1,2 µM(Albuquerque et al. 1973). De la misma manera Daly y colaboradores en 1980 estudiaron la sensibilidad de preparaciones de tejido nervioso y muscular de ranas del género *Phyllobates terribilis* a la acción de BTX y encontraron que estas ranas son insensibles a 5 µM de este alcaloide(J. Daly et al. 1980)

La PTX A y B fueron aisladas de una población de ranas venenosas de Panamá, *Oophaga pumilio*(JW. Daly and Myers 1967)(Grant et al. 2006), en el presente se han encontrado en la piel de estos anuros, más de 80 PTX, alopumiliotoxinas y homopumiliotoxinas(JW. Daly, Spande, and Garraffo 2005). La PTX parece ser la responsable de la actividad cardiotónica de los canales de sodio, que la convierte en un posible fármaco para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva. La probable fuente de la PTX son unos pequeños ácaros de la familia Scheloribatidae and Oribatidae(Takada et al. 2005), pero también se ha detectado en hormigas(Saporito and Garraffo 2004).

La HTX fue aislada de *Oophaga sylvatica*(JW. Daly et al. 1971), su función es bloquear la activación de los receptores nicotínicos de acetilcolina, bloqueando la contracción muscular. Todas las poblaciones de *Oophaga histrionica* y *O. sylvatica* del suroeste de Colombia y del noroeste de Ecuador, son consideradas *O. sylvatica*(Lötters et al. 1999).

La epibatidina, es un alcaloide similar a la nicotina(Fisher et al. 1994), fue descubierta en la rana *Epipedobates anthonyi* del Ecuador tiene una potente actividad analgésica, más de 200 veces mayor que la morfina(Neuwirth et al. 1979)(C. Myers and Daly 1983)(JW. Daly, Garraffo, and Spande 1999)(JW. Daly, Spande, and Garraffo 2005). Este alcaloide ha sido importante en el estudio de receptores nicotínicos. Actualmente se desconoce la fuente de la epibatidina(Kahn et al. 2016).

Se han aislado otros tipos de alcaloides de la piel de esta familia de anuros, como son decahidroquinolinas, y una variedad de izidinas, que incluyen pirrolizidina, indolizidina y quinolizidina(Jones et al. 1999).

Los alcaloides encontrados en los dendrobátidos han demostrado ser herramientas de investigación importantes en el estudio de los canales de Na^+ y su interacción con AL, anticonvulsivantes y antiarrítmicos(JW. Daly et al. 2000) .

Los AL han mostrado ser antagonistas no competitivos de la BTX a través de la competencia por el sitio de unión(Catterall 1981)(JW. Daly 1982). Estudios han demostrado que estos fármacos bloquean la acción de la BTX en axón de calamar(Albuquerque, Seyama, and Narahashi 1973), diafragma de rata(Alburquerque et al. 1976), electroplaca de anguila eléctrica(Bartels de Bernal, Llano, and Díaz 1975), nervio de rana(Khodorov et al. 1975), entre otros(JW. Daly 1982).

En un estudio realizado en 1998 crearon un canal de Na^+ de músculo esquelético de rata resistente a BTX, cambiando dos residuos (N434K y L437K) en el segmento IS6 y evaluaron la sensibilidad de algunos AL, los resultados mostraron que la unión de los AL en el canal de Na^+ resistente a BTX se redujo significativamente; el objetivo de este estudio fue demostrar que residuos en el sitio de unión de la BTX pueden afectar la unión de los AL en un sitio separado, incluso sin la presencia del alcaloide(G. Wang, Quan, and Wang 1998), como se observa en la **Fig. 26**.

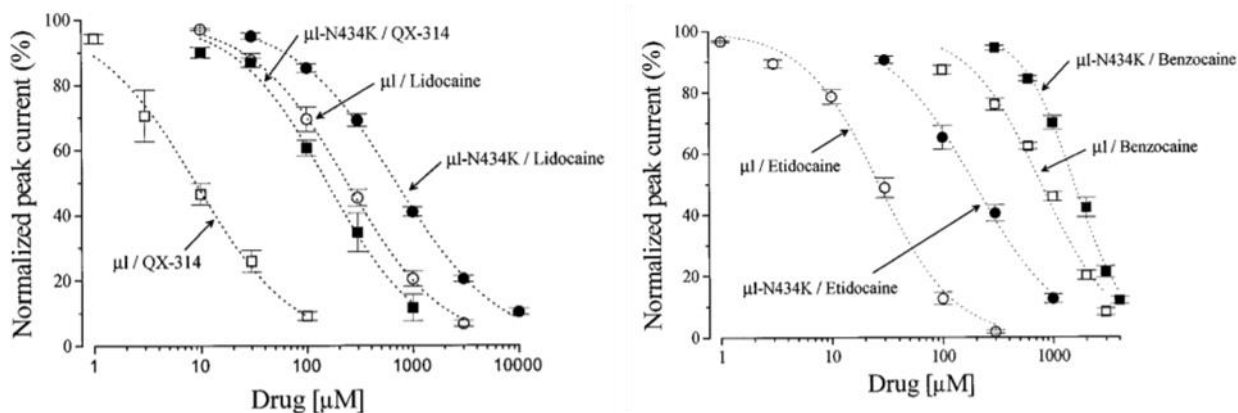


Fig. 26 Curva dosis respuesta de la variante natural del canal de músculo esquelético de rata ($\mu 1$) y el canal resistente a BTX ($\mu 1$ -N434K) con QX-314, lidocaína, etidocaína y benzocaína. (G. Wang, Quan, and Wang 1998)

De esta manera si las ranas del género *Phyllobates* perteneciente a la familia Dendrobatidae presentan resistencia o insensibilidad a la BTX se creería que suceda lo mismo con los AL; por lo tanto, estudios moleculares comparativos, realizados entre receptores sensibles e insensibles a fármacos, permitiría conocer y modelar los sitios receptores de dichas moléculas y su función como moduladoras y por lo tanto proponer el diseño de fármacos más específicos.

En este proyecto se trabajó con seis especies pertenecientes a la familia Dendrobatidae; dos especies de la subfamilia Colostethinae, *Colostethus fraterdanieli* y *Epipedobates boulengeri*; cuatro especies de la subfamilia Dendrobatinae, *Phyllobates aurotaenia*, *Oophaga histrionica*, *Andinobates bombetes* y *Andinobates minutus*.

4.4.1. *Colostethus fraterdanieli*

El género *Colostethus* presenta colores más crípticos a diferencia de los otros dendrobátidos, ocupan casi todos los ecosistemas con pluviosidad relativa media y alta. Se reconocen para este género 17 especies (Acosta 2017).

Los machos de *Colostethus fraterdanieli* presentan una longitud rostro – cloaca de 20 a 24,9 mm, mientras que las hembras presentan una longitud un poco mayor de 22,7 a 27 mm. La garganta de los machos presenta manchas oscuras, mientras que la de las hembras es clara; el abdomen presenta un color blanco claro; las extremidades presentan

barras oscuras transversales bien definidas que se extienden dorsalmente sobre los muslos, entre franjas oscuras longitudinales que bordean franjas de color amarillo claro(Grant and Castro 1998), como se observa en la **Fig. 27**.



Fig. 27 *Colostethus fraterdanieli*. Foto de Fernando Castro

Esta especie es terrestre y se encuentra distribuida en los bosques andinos de ambas vertientes de las cordilleras Occidental y Central, en los departamentos de Antioquia, Caldas, Cauca, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca; entre los 650 y 2.740 msnm(Bernal and Lynch 2008).

4.4.2. *Epipedobates boulengeri*

El género *Epipedobates* contiene siete especies descritas, las cuales se encuentran desde las tierras bajas del Pacífico de Ecuador y Colombia hasta 1800 m en la vertiente occidental de los Andes(Grant et al. 2006). En Colombia solo habitan dos de las siete especies, *Epipedobates boulengeri* y *Epipedobates narinensis*(Acosta 2017).

Los machos de la especie *Epipedobates boulengeri* o también conocida como Rana Jaspeada de Dardo venenoso(Frank and Ramus 1995), presentan una longitud rostro – cloaca de 15 a 20 mm, mientras que las hembras presentan una longitud mayor, entre 17 y 21 mm. El dorso presenta una coloración marrón a marrón rojiza, con dos líneas dorso laterales longitudinales de color amarillo crema. El vientre es negro con manchas blancas; las partes inferiores de las extremidades posteriores son de color azul cielo y negro (**Fig. 28**). La piel de estas ranas es completamente lisa a excepción del dorso; el cual en algunos individuos es un poco granular(Kahn et al. 2016).



Fig. 28 *Epipedobates boulengeri*. Foto de Fernando Castro

La distribución de esta especie va desde los 10 hasta los 1460 msnm en las laderas costeras del Pacífico en Colombia y Ecuador; desde la parte sur del Chocó hasta la desembocadura del Río San Juan. Se encuentra en bosques húmedos, en lugares como la Isla de Gorgona y en los departamentos de Nariño, Cauca y Valle del Cauca, en Colombia y en Ecuador se encuentra en las provincias de Imbabura, Pichincha y Esmeraldas (Kahn et al. 2016). Los individuos de esta especie son terrestres y de hábitos diurnos que se alimentan de pequeños artrópodos e invertebrados, como hormigas, coleópteros y hemípteros (Silverstone 1976).

4.4.3. *Phyllobates aurotaenia*

El género *Phyllobates* contiene cinco especies descritas, que se encuentran desde Costa Rica hasta el Chocó de Colombia (Grant et al. 2006). En Colombia habitan solo tres especies: *Phyllobates aurotaenia*, *P. terribilis* y *P. bicolor* (Acosta 2017).

Los individuos de la especie *Phyllobates aurotaenia* presentan una longitud rostro – cloaca en promedio de 26,3 mm, las hembras son aproximadamente 7% más grandes que los machos. Presentan dos líneas dorso laterales longitudinales, que pueden ser de color verde o amarillo brillante, naranja dorado o naranja rojizo; estas líneas se conectan en la punta del rostro formando una U y se extienden a la base lateral de los muslos o terminan justo antes de la superficie de los muslos; el resto del cuerpo presenta un color negro (**Fig. 29**). La piel del vientre y extremidades es lisa, a diferencia, del dorso que es ligeramente granular (Kahn et al. 2016).



Fig. 29 *Phyllobates aurotaenia*. Foto de Fernando Castro

Los individuos de esta especie tienen la capacidad de almacenar alcaloides esteroidales como la BTX, la homobatracotoxina y la batracotoxinina A (Grant et al. 2006). *Phyllobates aurotaenia* contiene cantidades mucho más bajas de BTX (10 µg de homobatracotoxina y 20 µg de batracotoxina) que *P. terribilis* (300 µg y 500 µg, respectivamente) (C. . Myers, Daly, and Malkin B 1978).

La especie *Phyllobates aurotaenia* es endémica de Colombia, con hábitos diurnos y terrestres, se encuentra en las tierras bajas del Pacífico de la vertiente occidental de la Cordillera Occidental en el departamento del Chocó y Risaralda desde 60 hasta 520 msnm (Silverstone 1976) (C. . Myers, Daly, and Malkin B 1978); presente en bosques lluviosos primarios y ligeramente perturbados, a menudo se ven o se escuchan cantar desde colinas empinadas (Kahn et al. 2016).

4.4.4. *Oophaga histrionica*

El género *Oophaga* contiene nueve especies descritas, de las cuales cuatro se encuentran en Colombia; *Oophaga lehmanni*, *O. occultator*, *O. histrionica* y *Oophaga sylvatica* (Kahn et al. 2016).

La especie *Oophaga histrionica* es también conocida como Rana Arlequín Venenosa, por su coloración brillante (Frank and Ramus 1995). Los individuos de esta especie varían en tamaño, con una longitud rostro – cloaca de 26,8 a 34,1 mm en machos y de 26,3 a 34,8 mm en hembras (C. Myers and Daly 1976). Se conocen más de 30 morfos, con colores y patrones variables, como marrón, marrón oscuro o negro; pueden presentar manchas

blancas, blancas verdosas, amarillo o naranja pálido, amarillo o naranja brillante, rojo rosáceo, rojo brillante o azul cielo (**Fig. 30**) (Kahn et al. 2016).



Fig. 30 *Oophaga histrionica*. Foto de Fernando Castro

Los tres principales alcaloides encontrados en la piel de esta especie son HTX 283A, isodihidrohistrionicotoxina 285A y Alodihidrohistrionicotoxina 285C(Kahn et al. 2016).

Los individuos de esta especie son diurnos, terrestres y se encuentran distribuidas en los departamentos de Antioquia, Chocó, Risaralda y Valle del Cauca, desde el nivel del mar hasta 1000 msnm(“The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2. International Union for the Conservation of Nature (IUCN)” 2016).

4.4.5. Género *Andinobates*

Es un género de ranas pequeñas, en el cual se han descrito 15 especies, que se extienden desde Ecuador, a través de Colombia hasta Panamá. Las especies de este género, presentan diferentes tipos de coloración como marrón claro, rojo, verdoso, azulado y amarillo claro, algunas especies presentan un solo color(Kahn et al. 2016). Se caracterizan por acumular en su piel alcaloides lipofílicos(Grant et al. 2006).

4.4.5.1. *Andinobates bombetes*

Conocida como Rana venenosa del Cauca(Frank and Ramus 1995) o como Rana Rubí en el Valle del Cauca. Son individuos pequeños, con una longitud rostro – cloaca de 16,6 a 18,5 mm en machos y de 16,4 a 19,8 en hembras(JW. Daly and Myers 1980). La piel es ligeramente granular, de color típicamente negro, con dos líneas dorso laterales longitudinales, anchas, oblicuas y de color rojo, que convergen en la parte superior de la cabeza, también presentan pequeños puntos o manchas que inician en la cabeza y terminan en la mitad del cuerpo; el vientre es jaspeado amarillo verdoso o amarillo (Fig. 31)(JW. Daly and Myers 1980).



Fig. 31 *Andinobates bombetes*. Foto de Fernando Castro

Se han detectado en la piel de esta especie de anuros, alcaloides bicíclicos como indolizidina 223A y 231B y PTX 251D; y un alcaloide tricíclico ciclopentaquinolizidina 251F, el cual ha sido detectado solo en esta especie(JW. Daly, Spande, and Garraffo 2005).

Los individuos de esta especie son diurnos y terrestres, habitan bosques generalmente frescos, nublados y hábitats semiáridos alrededor del Cañón del Dagua; se encuentra en los departamentos del Valle del Cauca, Quindío, Caldas y Risaralda, entre los 800 y 2100 msnm. A menudo escalan varios metros, hasta alcanzar bromelias arbóreas, las cuales sirven como microhábitats de esta especie, por su capacidad para retener agua(Kahn et al. 2016).

4.4.5.2. *Andinobates minutus*

Conocida como rana venenosa de vientre azul(Frank and Ramus 1995), su nombre *minutus* se debe a su diminuto tamaño, con una longitud rostro – cloaca de 12 a 15 mm(Silverstone 1975). La piel es ligeramente granular, el color del dorso es negro o marrón oscuro con manchas irregulares de color amarillo metálico, naranja o naranja rojizo, formando una línea media dorsal, posee líneas dorso laterales longitudinales, que inician detrás de las órbitas y se desvanecen en la parte posterior; tienen brillantes marcas de color en los antebrazos y muslos superiores (Fig. 32)(Kahn et al. 2016).



Fig. 32 *Andinobates minutus*. Foto de Fernando Castro

De la piel de estos anuros se han extraído alcaloides bicíclicos como PTX y alopumilitoxina(C. Myers and Daly 1976), también se han detectado indolizidinas 223A y 231B(JW. Daly, Spande, and Garraffo 2005).

Los individuos de esa especie son diurnos y terrestres, habitan bosques tropicales lluviosos y húmedos, entre los 25 y 1098 msnm, desde Panamá hasta el Río Saija, en el departamento de Cauca en Colombia(“The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2. International Union for the Conservation of Nature (IUCN)” 2016)(Silverstone 1975).

4.5. Canal de sodio de músculo esquelético de *Phyllobates aurotaenia* y sitio receptor de BTX y AL

La BTX es una de las toxinas más potentes, encontrada en la piel de las ranas del género *Phyllobates*, es un alcaloide lipofílico activador de los canales de Nav que causa apertura sostenida de estos canales, desplazando la activación a potenciales más hiperpolarizados y desactivando tanto la inactivación rápida como la lenta (Albuquerque, Daly, and Witkop 1971). Se ha propuesto que los canales Nav de estos anuros son insensibles a cantidades letales de BTX, por lo tanto, es de utilidad conocer la estructura de la BTX y su sitio receptor en los Nav, y de esta manera tratar de entender cómo es su interacción molecular con estos canales.

Se conoce la estructura cristalina de la BTX (JW. Daly, Garraffo, and Spande 1993), pero su sitio receptor en los Nav no se conoce con total precisión, los estudios realizados hasta la fecha han mostrado que esta toxina se une al sitio 2 para las neurotoxinas en los Nav (Blumenthal and Seibert 2003) (Suppiramaniam, Abdel-Rahman, and Buabeid, MA. Parameshwaran 2010), sin embargo, se ha observado que algunas porciones del sitio 2 están involucradas también en la unión de los AL (Postma and Catterall 1984) (Linford et al. 1998) (S.-Y. Wang, Nau, and Wang 2000) (S.-Y. Wang, Barile, and Wang 2001). Igualmente, por medio de estudios de mutagénesis sitio dirigida junto con estudios de electrofisiología, se ha planteado que el sitio receptor de BTX está conformado por 11 residuos, distribuidos en el segmento transmembrana S6 de los cuatro dominios del canal (Linford et al. 1998) (S. Wang and Wang 1998) (S.-Y. Wang and Wang 1999) (Du et al. 2011).

Con base en esta información se ha construido un modelo de unión entre la BTX y los Nav y una de las predicciones de este modelo sugiere que la BTX se une a la región interna del poro del canal (Kosower 1983) (Tikhonov and Zhorov 2005) (S.-Y. Wang et al. 2006), lo que permitiría explicar la reducción del 50% de la conductancia unitaria de los Nav, observada como consecuencia de la acción de la BTX (Correa, Latorre, and Bezanilla 1991). La ubicación de la BTX en el poro del canal, unida a los cuatro segmentos transmembrana S6 de la subunidad α , contribuiría con la suficiente energía para estabilizar los Nav en su conformación abierta, sin embargo el modelo no explica el mecanismo por el cual la BTX elimina la inactivación rápida y lenta del canal durante despolarizaciones prolongadas, provocando de esta manera que el canal permanezca abierto por horas (S.-Y. Wang et al. 2006) (Krueger, Worley, and French 1983).

En la tesis de Doctorado de Santiago Castaño en el año 2011(Castaño 2011) se clonó, secuenció y analizó la estructura primaria del Nav de músculo esquelético (Nav1.4) de *Phyllobates aurotaenia*, con el fin de identificar lo que le confiere insensibilidad a este tipo de alcaloide; además se expresó funcionalmente la subunidad α en un sistema heterólogo. Como resultado de este estudio, se obtuvo la secuencia del Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia*, con una longitud de 1819 aminoácidos (**Fig. 33**), la cual al compararla con dos secuencias cercanas como lo son Nav1.4 de *Rattus norvegicus* y *Thamnophis sirtalis*, presentó una homología mayor del 70%, los segmentos transmembrana están conservados en un 87%, y de igual modo están conservados tanto el bucle intracelular entre S6 DIII y S1 DIV, donde se encuentra el motivo IFM involucrado en la inactivación rápida, la bisagra de la compuerta de activación (motivo GGGS) y el filtro de selectividad DEKA. Se encontró que de los 11 residuos que se han identificado en estudios de mutagénesis sitio dirigida como críticos para la interacción del canal con la BTX en Nav de mamífero, 9 de ellos se encuentran conservados en Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia*, además encontraron 2 residuos nuevos que no están conservados en los segmentos S6 que no habían sido considerados previamente como importantes para el sitio de unión de la BTX(Castaño et al. 2009).



Fig. 33 Estructura primaria del canal Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* (1819 aa.). Los segmentos transmembrana de cada dominio están resaltados con un color característico. Entre los segmentos S5 y S6 de cada Dominio están resaltados los motivos que integran el filtro de selectividad del canal y los residuos que integran el motivo DEKA están escritos en rojo (Castaño 2011).

Además de la caracterización estructural, se realizó la caracterización funcional, expresando este canal en oocitos de *Xenopus laevis* usando la técnica de “voltage clamp” y para el estudio del efecto de la BTX sobre Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* utilizaron el protocolo de transformación de canales, mostrado en la Fig. 34, con el objetivo de permitir que los canales se muevan entre el estado cerrado y abierto y de esta manera la BTX que se ha sugerido que se une al estado abierto del canal, lo puede encontrar abierto e irlo transformando.

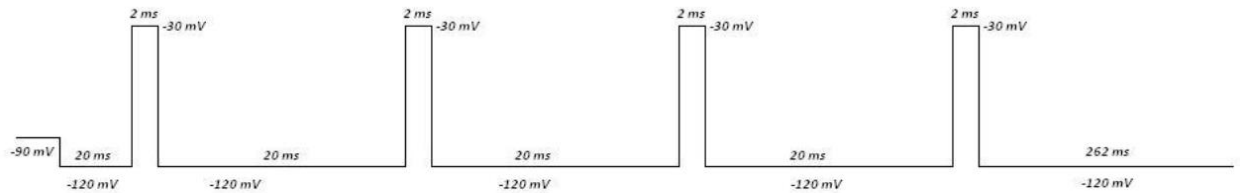


Fig. 34 Protocolo de transformación para promover la unión de la BTX a los Nav. El protocolo dura 360 ms en total y se repite de manera continua hasta que se observa la transformación completa de los Nav en presencia de BTX (S Castaño 2011).

Encontraron que la subunidad α del Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* al ser expuesta a 5nM de BTX, presenta inhibición de la inactivación del canal a los 40 min (Fig. 35B), promoviendo aparición de corrientes iónicas que no se inactivan y el desplazamiento de la curva de activación hacia potenciales más negativos; mientras que la subunidad α de *Rattus norvegicus* al ser expuesta a 5 nM de BTX, presenta transformación completa de su función a los 10 min de pulsos sucesivos (Fig. 35A).

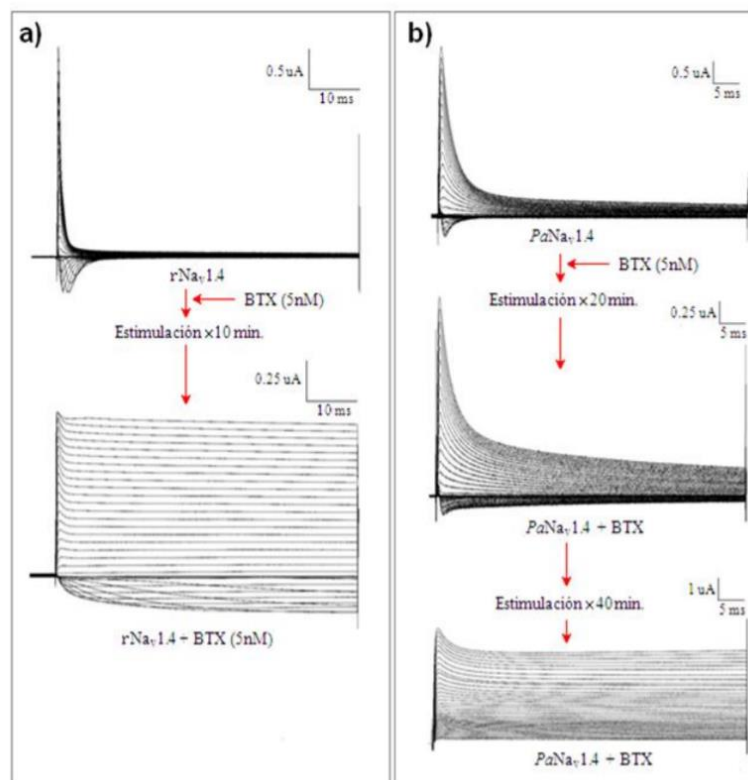


Fig. 35 Sensibilidad a la BTX. Efectos de la transformación de la subunidad alfa de los canales de sodio al exponerlos a 5nM de BTX. A. Nav1.4 de *Rattus norvegicus* B. Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* (S Castaño 2011).

Estos resultados indican, por lo tanto, que la subunidad α de Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* es “resistente” mas no insensible a la BTX como se había propuesto anteriormente por Albuquerque et al., 1993. Además, la BTX a concentraciones tan grandes como 10 μ M presenta un efecto significativamente menor en las corrientes de Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia*, comparado con las corrientes de Nav1.4 de rata, por lo que se propone que la BTX presenta menor afinidad por la subunidad α de Nav1.4 de la rana en estudio, que por su homólogo en rata. Esta menor afinidad se debe principalmente a la sustitución de dos Serinas (S428 y S1276) presentes en la subunidad α de Nav1.4 de rata, por dos Alaninas (A415 y A1292) presentes en la subunidad α de Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia*. Estas sustituciones se encuentran en el segmento transmembrana S6 del dominio I y III (Frezza et al. 2010).

Debido a los resultados observados del efecto de la BTX sobre el Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia*, en la tesis de Doctorado de Santiago Castaño, también se evaluó el efecto del AL bupivacaina, debido a que se ha propuesto que el sitio de unión de la BTX y de los AL se superponen. Para lo cual se expuso la subunidad α del Nav1.4 del anfibio en estudio a 200 μ M de bupivacaina, utilizando el protocolo de Wang y Wang (1996) (S.-Y. Wang and Wang 1996) analizaron la recuperación de la inactivación lenta, graficando (I/I_{max}), en función del tiempo de recuperación. Los experimentos también fueron contrastados con el efecto de la bupivacaina sobre la subunidad α del Nav1.4 de *Rattus norvegicus*. En la **Fig. 36** se observan las gráficas de la fracción de canales recuperados contra el tiempo de recuperación tanto del canal de *Phyllobates aurotaenia* como el de *Rattus norvegicus*. Estos resultados permiten evidenciar la aparente insensibilidad del canal del anuro en estudio a la bupivacaina, mientras que el canal de músculo de rata presenta el efecto modificador sobre la recuperación de la inactivación lenta.

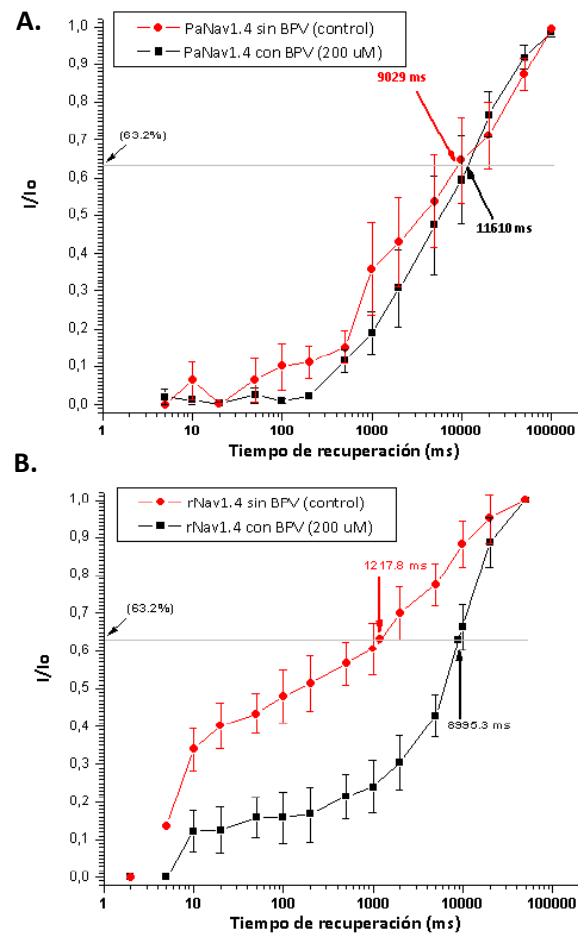


Fig. 36 Recuperación de la inactivación lenta en canales expuestos a bupivacaina. A. Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* **B.** Nav1.4 de *Rattus norvegicus* (S Castaño 2011).

Debido a los resultados obtenidos en la **Fig. 36**, en esta tesis, también se realizó alineamiento del segmento transmembrana S6 de los cuatro dominios (**Fig. 37**), ya que son los segmentos sobre los que se han propuesto residuos que interactúan tanto con BTX como con los AL.

Encontraron lo siguiente:

- El segmento transmembrana S6 DI presenta una sustitución de Serina (S) en rata por una Alanina (A) en la rana. Cambio que podría ser importante debido a que la Serina (S) es hidrofílica y la Alanina (A) es hidrofóbica. También presenta una sustitución de Isoleucina (I) en rata por Valina (V) es rana, ambos residuos son hidrofóbicos.
- El segmento transmembrana S6 DII está completamente conservado.
- El segmento transmembrana S6 DIII presenta también una sustitución de Serina (S) en rata por una Alanina (A) en rana.
- El segmento transmembrana S6 DIV presenta una sustitución de una Valina (V) en rata por una Isoleucina (I) en rana, ambos residuos son hidrofóbicos.
- En la rana se conservan los cuatro residuos propuestos por Wang en 1988 (G. Wang 1988) y Linford et al., en 1998 (Linford et al. 1998) como sitios receptores de los AL lo que no explica la insensibilidad del canal a los AL por la simple sustitución de estos.

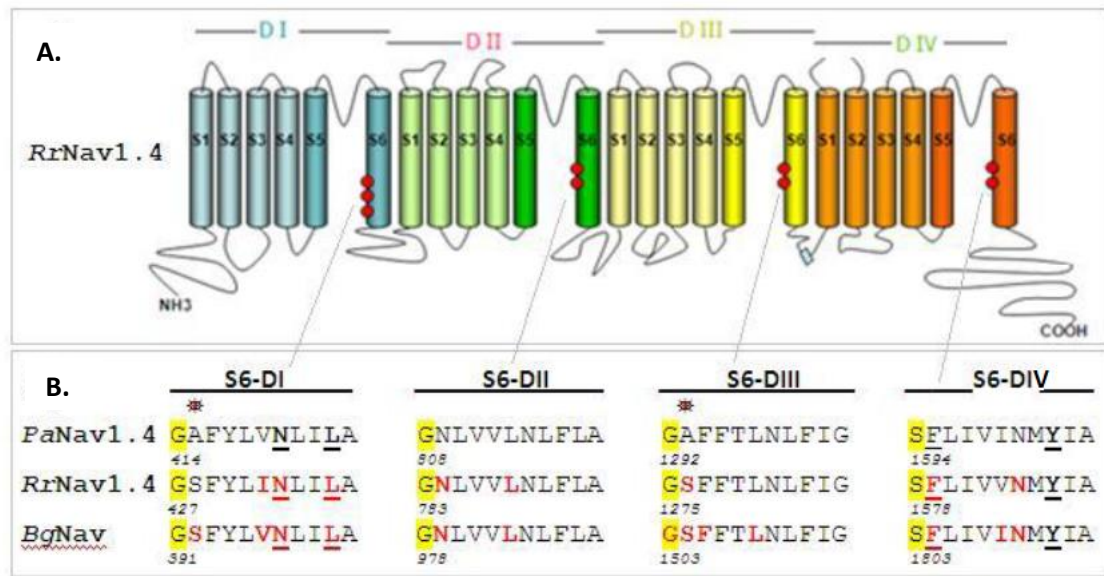


Fig. 37 Representación topológica de Nav. **A.** La estructura secundaria. **B.** Alineamiento de los S6 de la subunidad alfa de los canales rNav1.4 (*Rattus norvegicus*) y del PaNav1.4 (*Phyllobates aurotaenia*). Residuos críticos en la unión de BTX se encuentran en rojo. Residuos críticos en la unión de AL se encuentran subrayados.

De las dos sustituciones encontrados como importantes para el sitio de unión de BTX, una de ellas (S1276 de rata y A1292 de rana) también ha sido reportado como determinante para la unión de los AL; como lo reporta el grupo de Wang en el año 2000, en este estudio realizaron sustitución de Serina (S) por Lisina (K) (S1276K) y encontraron que al expresar el canal mutado en células de mamíferos, este era completamente resistente a 5 mM de BTX durante pulsos repetitivos, al igual mostraba una reducción de afinidad de 10 a 20 veces por el AL bupivacaína (S.-Y. Wang, Nau, and Wang 2000).

5. METODOLOGÍA

5.1. Marco legal vigente

Este proyecto fue presentado y aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle por medio del código interno 013-014. De igual manera para dar cumplimiento a la legislación colombiana vigente relacionada con la protección de la biodiversidad, se realizaron todos los trámites correspondientes para la obtención del permiso de recolección regido por el Decreto 1376 de 2013 y la obtención del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos regido por la Decisión Andina 391 y por la resolución 1348 de 2014, avalado y emitido por el Ministerio de Ambiente. Previo a la solicitud del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos, fue necesario realizar la consulta previa sobre la presencia o no de comunidades étnicas en las zonas de recolección, solicitada al Ministerio de Interior, cuya certificación aclara que no se registra presencia de comunidades indígenas, minorías, ROM, negras, afrocolombianas, raizales y palenqueras en el área del proyecto (certificación número 175 del 26 de febrero de 2015). Posterior a esta certificación, se presentó toda la documentación solicitada y el Ministerio de Ambiente emitió la resolución 1469, por la cual se resuelve un recurso de reposición y se acepta una solicitud de Acceso a Recursos Genéticos y productos derivados; una vez se renunciaron a términos para interponer el recurso de reposición, se procedió a la firma del contrato de Acceso a Recursos Genéticos y productos derivados No. 143.

5.2. Especies elegidas y área de muestreo

En este proyecto, se trabajó con 6 especies de ranas de la Familia Dendrobatidae. Varios de ellos, simpátricos en el pacífico del Chocó geográfico del Valle del Cauca. Las especies elegidas fueron *Phyllobates aurotaenia*, *Oophaga histrionica*, *Epipedobates boulengeri*, *Andinobates bombetes*, *Andinobates minutus* y *Colostethus fraterdanieli*. También se trabajó con una especie de la familia Eleutherodactylidae, *Eleutherodactylus johnstonei* como especie control.

Los anfibios fueron colectados en las siguientes zonas del Valle del Cauca: *Phyllobates aurotaenia* en Piangüita en el municipio de Buenaventura, *Epipedobates boulengeri* y *Andinobates minutus* en la base naval del Pacífico (Bahía Málaga), ubicada en el municipio de Buenaventura; *Oophaga histrionica* en el corregimiento El Naranjo, ubicado en el municipio de Dagua; *Andinobates bombetes* en la Reserva Forestal Bosque de Yotoco en el municipio de Yotoco y tanto *Colostethus fraterdanieli* como la especie control *E.*

johnstonei fueron colectadas en la Universidad del Valle, sede Meléndez, en el municipio de Santiago de Cali.

5.3. Fase de laboratorio

5.3.1. Número de especies capturadas y disección de músculo esquelético

El número de ranas colectado para cada especie se basó en la cantidad de tejido necesario (músculo esquelético) para realizar extracción de ARN total, que según el kit utilizado es de 25 mg de tejido por cada especie. Por lo tanto, se colectó 1 individuo de la especie *Phyllobates aurotaenia*, 2 individuos de *Epipedobates boulengeri*, 3 individuos de *Andinobates minutus*, 1 individuo de *Oophaga histrionica*, 2 individuos de *Andinobates bombetes*, 2 de *Colostethus fraterdanieli* y 2 individuos de la especie control.

Los procedimientos se realizaron provocando el menor estrés y dolor a las ranas, con el fin de mantener al mínimo el sufrimiento de los animales. Para la disección del músculo esquelético, fue necesario realizar bloqueo medular, no obstante, el corazón y la irrigación sanguínea debían seguir funcionando, para garantizar la estabilidad del ARN extraído.

Cada individuo capturado, se introdujo en un recipiente a baja temperatura, para disminuir su metabolismo. Las ranas expuestas a este procedimiento muestran aletargamiento a los 10 segundos y a los 15 segundos exponen un tipo de “parálisis por hipotermia”. Este proceso puede ser revertido colocando la rana a temperatura ambiente. Una vez la rana entraba en “parálisis”, se empleó un micropunzón para inducir descerebración a través del foramen magno. Luego se retiraron las pieles, se depositaron en viales con etanol (grado HPLC) y se almacenaron a 4°C (para el uso en proyectos posteriores). Posteriormente fueron extraídos los músculos de las extremidades posteriores, cortados en rodajas de menos de 0,5 cm de espesor y almacenados en “RNAlater” (Qiagen) (agente para estabilizar el ARN), se garantizó la integridad del ARN, utilizando el volumen apropiado (10 µL de RNA later por 1 mg de tejido) y haciendo que los tejidos quedaran completamente sumergidos en el reactivo, finalmente se almacenaron a 4°C para garantizar una estabilidad hasta por 4 semanas. Este procedimiento no tuvo una duración mayor a dos minutos por cada individuo.

5.3.2. Extracción del ARN total de músculo esquelético

El tejido extraído de músculo esquelético y almacenado en RNA later a 4°C, se retiró cuidadosamente con pinzas (previamente esterilizadas) y se introdujo en un mortero de porcelana, debidamente lavado y esterilizado. Al mortero se le vierte nitrógeno líquido previo al procedimiento. El músculo congelado fue macerado hasta convertirlo en polvo, posteriormente se empleó el “kit RNeasy Plus Mini Kit” (Qiagen) con el buffer de lisis Qiazol (Qiagen), para extraer el ARN total, es decir todo el conjunto de ARN mensajeros que hacen parte de la función celular muscular incluyendo los ARN ribosomales. El diagrama de flujo del protocolo se observa en la **Fig. 38**.

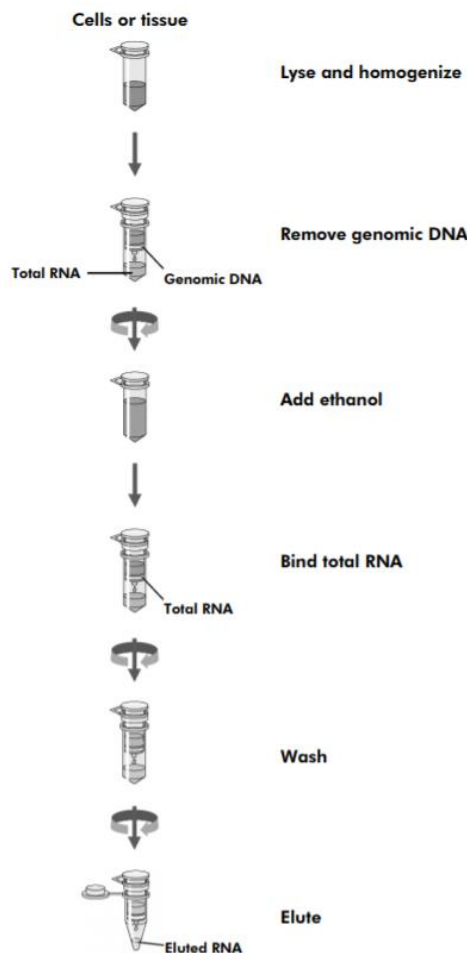


Fig. 38 Diagrama de flujo de la extracción de ARN total. Tomado de RNeasy Plus Mini Handbook (Qiagen)

Una vez obtenido el ARN total, se resuspendió en agua libre de RNasas y se verificó su concentración y pureza con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Posteriormente el ARN extraído fue almacenado a -80°C hasta su siguiente reacción. La integridad y la distribución del ARN total se verificó por la presencia de dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S, con un peso molecular aproximado de 5kb y 1,9kb respectivamente, en una electroforesis en gel de agarosa con reactivo desnaturalizante para ARN (formaldehído 37%), buffer MOPS-EDTA-Sodium Acetato (SIGMA) y tinción con bromuro de etidio, de acuerdo con lo recomendado en el manual (Qiagen, Bench Guide). La presencia de las dos bandas demostrará que el ARN no se encuentra degradado y probablemente estén estables los ARN mensajeros.

5.4. Secuenciación del ARN total de músculo esquelético

El ARN total de músculo esquelético de las seis especies de Dendrobátidos y la especie control (*Eleutherodactylus johnstonei*) fueron enviadas a la empresa Omega Bioservices para el proceso de secuenciación “paired end” de ARN (RNA-seq). En este servicio nuevamente midieron la concentración del ARN con un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific Inc.) y la integridad usando un sistema Agilent 2200 TapeStation. Igualmente prepararon las librerías, realizaron la secuenciación usando el sistema HiSeq 2500 y el almacenamiento de datos finales en la plataforma Illumina BaseSpace® (Fig. 39)

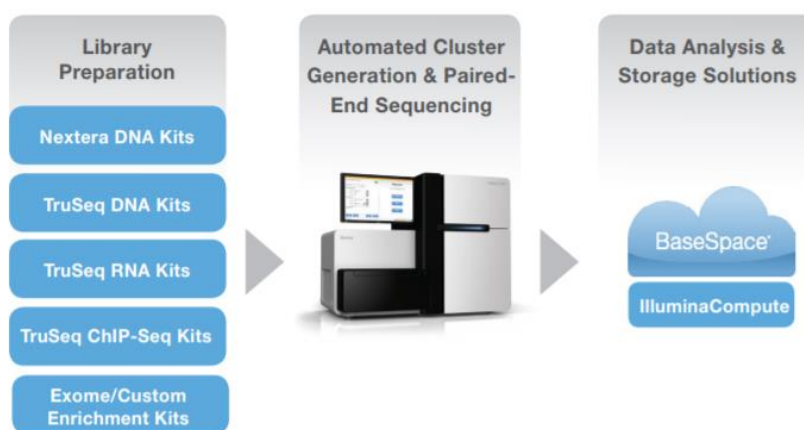


Fig. 39 Diagrama del proceso de secuenciación. Tomado de la hoja de especificaciones del sistema HiSeq 2500 de Illumina®.

5.5. Fase de bioinformática

5.5.1. Verificación de calidad, ensamblado y alineamiento de secuencias

Para esta parte inicial de la fase de bioinformática, se utilizó el portal web Galaxy, el cual es un servidor público y gratuito (Giardine et al. 2005). Los datos finales producto del proceso de secuenciación almacenados en la plataforma Illumina BaseSpace®, fueron cargados en este servidor en formato Fastq y por medio de la herramienta FastQC se realizó un control de calidad de los datos de la secuencia sin procesar; el análisis obtenido por medio de esta herramienta permite dar una impresión rápida de si los datos presentan algún problema que se debe tener en cuenta antes de realizar un análisis posterior. Una vez evaluado la calidad de los datos, se realizó el ensamble del transcriptoma de Novo con la herramienta Trinity, que usa los datos de RNA-seq como entrada, este método no requiere un genoma de referencia para reconstruir el transcriptoma y por último se alinearon los transcritos obtenidos con la herramienta TopHat. Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las seis especies de dendrobátidos al igual que para la especie control (*Eleutherodactylus johnstonei*). El diagrama de flujo de esta fase se muestra en la **Fig. 40**.

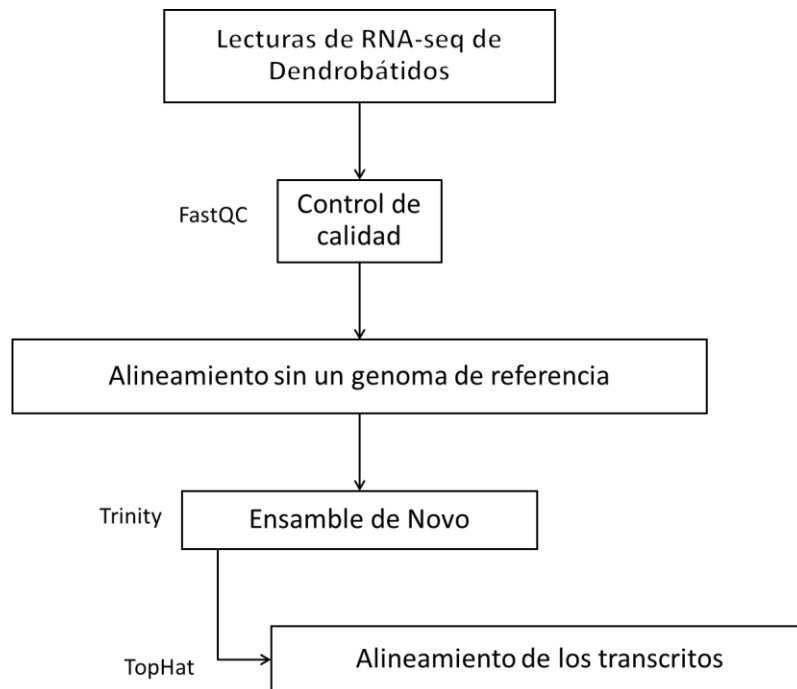


Fig. 40 Diagrama de flujo RNA-seq.

5.5.2. Búsqueda de secuencias de ADNc que codifican para la subunidad α de los Nav1.4

El primer parámetro utilizado para encontrar las secuencias de ADNc que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las especies de estudio, fue la longitud de los transcritos, por lo que se realizó una búsqueda en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) de secuencias completas de ADNc o ARNm que codifiquen específicamente para la subunidad α de los Nav de vertebrados, se registró la longitud en pares de bases de cada una de las secuencias obtenidas y se estableció una longitud mínima y máxima de todas las secuencias encontradas. Con estos dos parámetros y con los transcritos ensamblados de cada una de las seis especies de dendrobátidos y de la especie control (*Eleutherodactylus johnstonei*), se desarrolló un algoritmo con el software Qt Creator (plataforma para el desarrollo de aplicaciones con interfaces gráficas de usuario) para la búsqueda de las secuencias de ADNc que codifican para la subunidad α de los Nav1.4, cuya interfaz de usuario se observa en la **Fig. 41**. El resultado obtenido con este algoritmo es guardado automáticamente en un archivo FASTA con todos los transcritos ensamblados que se encontraron en el rango de longitud establecido para cada una de las especies de estudio. En cada búsqueda que el algoritmo realiza, se reporta el número total de transcritos hallados en el rango de búsqueda.

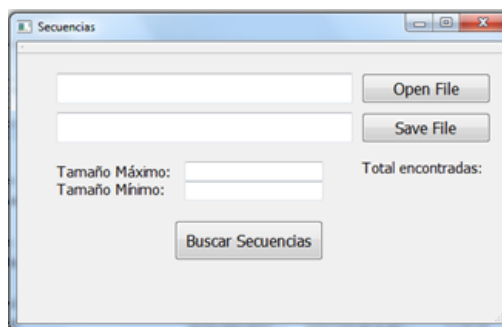


Fig. 41 Aplicación utilizada para búsqueda de secuencias primarias de Nav.

El archivo FASTA de cada una de las especies de estudio, con los transcritos encontrados en el rango de búsqueda, se sometió a Nucleotide BLAST® (Basic Local Alingment Search Tool) programa que se usa gratuitamente desde el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), el cual comparó el archivo FASTA con las secuencias reportadas en las bases de datos y se identificó el transcrito con el mayor parecido al Nav. De esta manera se obtuvo la secuencia de ADNc que codifica para la subunidad α del Nav de músculo esquelético de cada uno de los seis dendrobátidos y de *Eleutherodactylus johnstonei*.

5.5.3. Búsqueda del marco abierto de lectura (ORF)

Para la búsqueda del marco abierto de lectura, (ORF de sus siglas en ingles Open Reading Frame) cada una de las secuencias de ADNc que codifican para la subunidad α del Nav encontradas anteriormente, fueron sometidas al programa ORFfinder disponible en el servidor del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). En la **Fig. 42** se muestra la interfaz de este programa, en ella se ingresó la secuencia en formato FASTA y se escogió el codón de inicio ATG. Esta herramienta dio como resultado un conjunto de ORF's encontrados, la posición del codón de inicio, del codón de parada y la longitud total en pares de bases y en residuos de cada uno de los ORF's. Para evaluar que el marco abierto de lectura correspondía con la secuencia de Nav, con ORFfinder se hizo la traducción a proteína de cada uno de los ORF encontrados y luego fueron sometidos a SMARTBLAST. Posteriormente el ORF de la secuencia de ADNc que codifica para la subunidad α de Nav de cada una de las especies de estudio, se descargó en formato FASTA.

Enter Query Sequence

Enter accession number, gi, or nucleotide sequence in FASTA format:

From: To:

Choose Search Parameters

Minimal ORF length (nt): 75

Genetic code: 1. Standard

ORF start codon to use:

- ☒ "ATG" only
- ☐ "ATG" and alternative initiation codons
- ☐ Any sense codon

Ignore nested ORFs: ☐

Start Search / Clear

Submit Clear

Fig. 42 Interfaz del programa ORFfinder.

5.5.4. Alineamiento y caracterización de la estructura primaria de la subunidad α de los Nav1.4

Las secuencias de ADNc encontradas anteriormente, fueron traducidas a proteína con la subrutina de traducción que cuenta el software MEGA 7 (S. Kumar, Stecher, and Tamura 2016), una vez llevado a cabo este proceso, se realizó un alineamiento múltiple con la subrutina MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) de las seis especies de estudio, la especie control *E. johnstonei*, de la secuencia de Nav1.4 de *Phyllobates aurotaenia* obtenida en la tesis del profesor Santiago Castaño y la secuencia de Nav1.4 de rata encontrada en las bases de datos fue utilizada como especie externa en este proyecto. Igualmente se diseñó por medio de Protter (Omasits et al. 2014) (herramienta Web para análisis interactivo de proteínas) una visualización interactiva de la disposición de cada uno de los segmentos transmembrana de cada uno de los cuatro dominios de la subunidad α del Nav de una de las especies de estudio *P. aurotaenia*.

5.5.5. Construcción de árboles filogenéticos de secuencias primarias, dominios y motivos funcionales y estructurales de los Nav1.4

Para evaluar las similitudes entre las secuencias primarias de Nav1.4 de las seis especies de dendrobátidos, la especie control *Eleutherodactylus johnstonei* y la especie externa *R. norvegicus*, se construyeron árboles filogenéticos de la secuencia completa, de cada uno de los cuatro dominios, de los extremos amino y carboxilo terminal, de los bucles que unen cada uno de los dominios y de los segmentos formadores del poro en cada uno de los dominios. Se utilizó CIPRES (M. Miller, Pfeiffer, and Schwartz 2010) que es un recurso público para inferencia de árboles filogenéticos que funciona a través de un servidor. En este portal se utilizó el algoritmo RAxML (Randomized Accelerated Maximum Likelihood), para la construcción de árboles filogenéticos usando el método de Máxima Verosimilitud y se calculó el valor de Bootstrap, el cual es un análisis de re-muestreo que implica reconstruir el árbol varias veces y probar si se presentan los mismos nodos en las repeticiones; este análisis se hace a través de muchas iteraciones; si por ejemplo se obtiene el mismo nodo en 95 de 100 iteraciones, quiere decir que el nodo está bien soportado, por medio del Bootstrap se obtiene un valor de confianza de cada uno de los nodos. Una vez generado el árbol este se obtuvo en formato Newick, el cual representa los árboles como archivos de texto, usando paréntesis y comas y para visualizar gráficamente los árboles obtenidos, se utilizó el software FigTree versión 1.4.3 (Rambaut 2007).

5.5.6. Identificación de residuos involucrados en inactivación rápida y lenta

En este proyecto se realizó una búsqueda de los residuos involucrados con inactivación rápida e inactivación lenta que han sido reportados por otros autores y se diseñó una visualización interactiva por medio de Protter (Omasits et al. 2014) de cada uno de los residuos alrededor de la membrana, esto con el objetivo de encontrar reemplazos de aminoácidos en nuestras especies de estudio que estén involucrados con estos estados del canal de sodio dependiente de voltaje, debido a que la inactivación modula la afinidad de los Nav por diversos agentes químicos en particular los anestésicos locales y fármacos de acción similar.

5.5.7. Construcción de árboles filogenéticos de los segmentos implicados en el sitio receptor de AL y BTX en los Nav1.4

El mismo procedimiento descrito anteriormente se utilizó para construir los árboles filogenéticos de los segmentos S6 de cada uno de los cuatro dominios, los cuales contienen residuos que han sido reportados como importantes en el sitio receptor tanto de los AL como de BTX en el Nav1.4 de rata; esto con el objetivo de encontrar reemplazos de aminoácidos tanto en las seis especies de dendrobátidos como en la especie control *Eleutherodactylus johnstonei*, que puedan estar involucrados en el sitio receptor de AL.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. CAPÍTULO I: Descripción de las secuencias primarias que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las especies de estudio

Con el propósito de cumplir con el primer objetivo que consiste en describir las secuencias primarias que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las seis especies de dendrobátidos en este capítulo se exponen dos fases, la primera consiste en la obtención del material genético de las especies de estudio y una segunda fase de bioinformática, que involucra desde la verificación de calidad y ensamblado hasta el alineamiento de las secuencias primarias, resaltando los cuatro dominios y los seis segmentos transmembrana de cada dominio, junto con el filtro de selectividad DEKA y el segmento de inactivación IFM.

6.1.1. Extracción de ARN total de músculo esquelético

La concentración y pureza de cada una de las muestras de ARN total extraído de músculo esquelético de las seis especies de dendrobátidos y la especie control *Eleutherodactylus johnstonei*, se verificó por medio de un espectrofotómetro Nanodrop. El volumen total extraído para cada muestra fue de 50 μL y la relación de absorbancia 260/280 se usó para evaluar la pureza del ARN. En la **Tabla 4** se observan los resultados, en los cuales se muestra una concentración total para cada una de las muestras mayor a 7 μg y una relación 260/280 entre 1,8 y 2, lo que indica que no existe contaminación con proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente en 280 nm o cerca de este valor.

Tabla 4 Concentración y pureza de las muestras de ARN total

Especie	Concentración	Relación 260/280
<i>E. johnstonei</i>	220,8 ng/ μL	1,89
<i>E. boulengeri</i>	368,2 ng/ μL	2
<i>P. aurotaenia</i>	142,8 ng/ μL	1,96
<i>A. minutus</i>	167 ng/ μL	1,83
<i>O. histrionica</i>	175,5 ng/ μL	1,95
<i>A. bombetes</i>	304,5 ng/ μL	1,92
<i>C. fraterdanieli</i>	209,4 ng/ μL	1,89

De igual manera se verificó la integridad y la distribución del tamaño del ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa con formaldehído como agente desnaturalizante, y los resultados para cada una de las especies de estudio mostraron dos bandas intensas correspondientes al ARNr 28s (peso aproximado de 5 kb) y a el ARNr 18s (peso aproximado de 1,9 kb), como se muestra en la **Fig. 43**. Igualmente se observa que la banda de ARNr 28s es aproximadamente el doble de intensa que la banda de ARNr 18s, lo que es un buen indicador de que el ARN está intacto (El ARN parcialmente degradado tendría un aspecto manchado sin bandas fuertes y el ARN totalmente degradado aparecería como una mancha de muy bajo peso molecular).

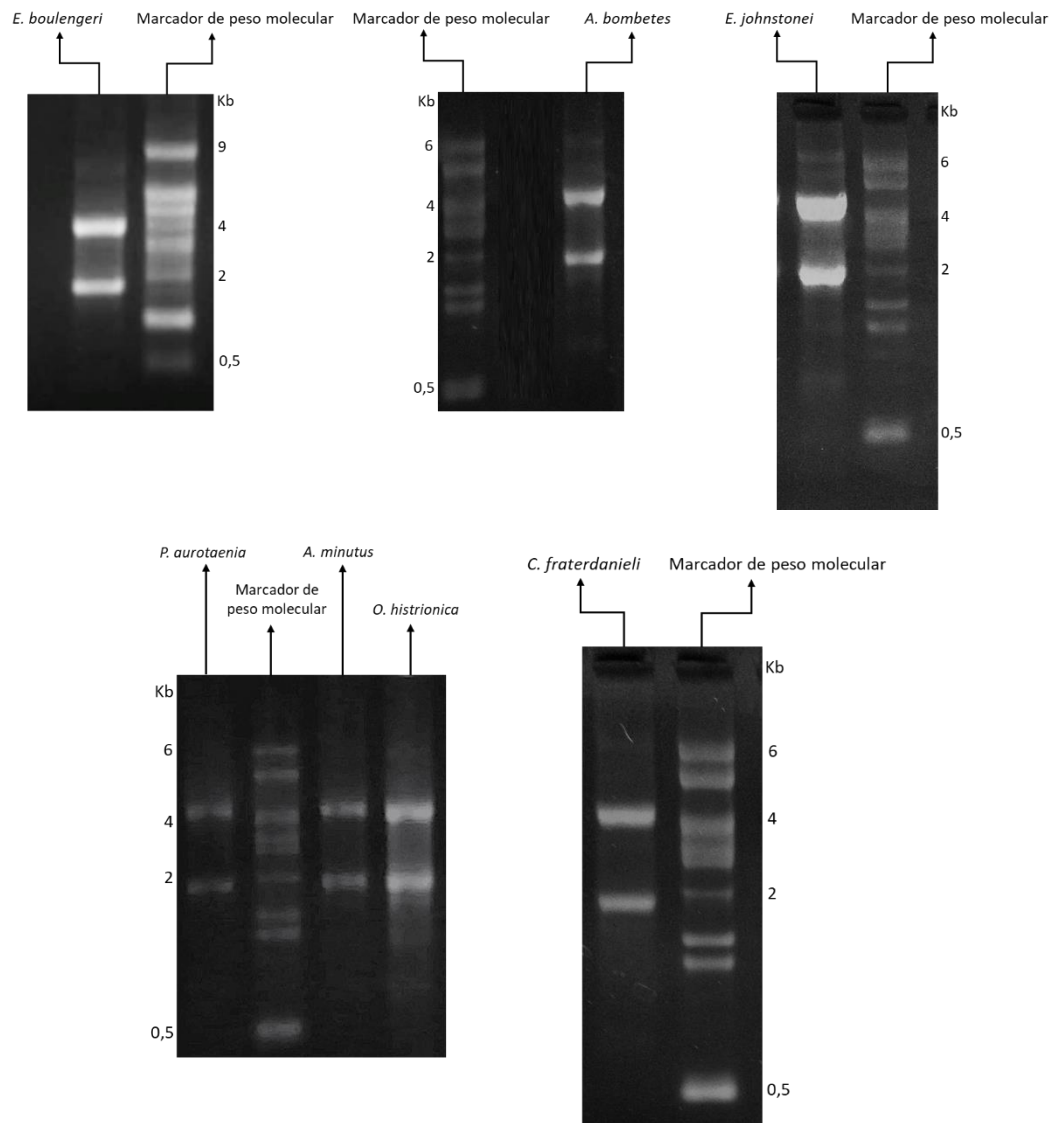


Fig. 43 Electroforesis en gel de agarosa para cada una de las especies de estudio.













6.1.2. Fase de bioinformática

6.1.2.1. Verificación de calidad, ensamblado y alineamiento de las secuencias obtenidas

Los resultados obtenidos del proceso de secuenciación de las muestras de ARN total de músculo esquelético de cada una de las especies de estudio realizado por la empresa Omega Bioservices, fueron descargados de la plataforma Illumina BaseSpace® y cargados en formato Fastq en el portal web Galaxy. El primer análisis tuvo como objetivo hacer algunas comprobaciones del control de calidad de los datos provenientes del proceso de secuenciación y así detectar problemas que se pudieron haber originado ya sea en el secuenciador o en el material de la librería de inicio, para este análisis se usó la herramienta FastQC, que se encarga de evaluar una serie de módulos, cuyo resultado puede tener una marca de aprobación (✓) que indica que los datos son aptos para realizarles análisis adicionales, o un signo de exclamación (!) si se encuentra algo inusual en los datos por ejemplo que las secuencias no presenten la misma longitud, en algunas ocasiones este resultado puede afectar análisis posteriores, o una X que indica que hay algo mal en los datos, por ejemplo si alguna de las secuencias tiene una longitud cero, lo que quiere decir que los datos obtenidos del proceso de secuenciación no son aptos para realizarles análisis posteriores.

En la **Fig. 44** se muestra el resultado de cada uno de los 12 módulos analizados por medio de la herramienta FastQC, para las especies de estudio, donde se observa que 7 de los 12 módulos presentan marcas de aprobación, lo que indica que en términos generales se cuenta con una secuencia apta para análisis posteriores.

Summary

-  [Basic Statistics](#)
-  [Per base sequence quality](#)
-  [Per tile sequence quality](#)
-  [Per sequence quality scores](#)
-  [Per base sequence content](#)
-  [Per sequence GC content](#)
-  [Per base N content](#)
-  [Sequence Length Distribution](#)
-  [Sequence Duplication Levels](#)
-  [Overrepresented sequences](#)
-  [Adapter Content](#)
-  [Kmer Content](#)

Basic Statistics

Measure	Value
Filename	124-_S4_L001_R1_001.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	12475904
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-101
%GC	47

Fig. 44 Resultado del análisis de los 12 módulos con la herramienta FastQC. El resultado del módulo de estadística básica muestra el nombre del archivo analizado, el conteo del total de secuencias procesadas muestra la longitud de la secuencia más larga (101 pares de bases) y la secuencia más corta (35 pares de bases) y el porcentaje de guanina-citosina total en todas las secuencias.

Sin embargo, se encontraron unos módulos con un signo de exclamación; mostrados en la **Fig. 45**, como son; el contenido de pares de bases de la secuencia, la distribución de la longitud de la secuencia y las secuencias sobre representadas. El contenido de pares de bases de la secuencia, muestra en un gráfico la proporción de cada base nitrogenada, se espera que exista poca o ninguna diferencia en la proporción de cada una de las bases, es decir que las líneas mostradas en la **Fig. 45A** sean paralelas entre sí; este módulo emite un signo de exclamación si la diferencia entre A y T o G y C es superior al 10% en cualquier posición en la lectura; en este caso se observa una composición diferente al inicio de la lectura, que en la mayoría de los casos no afecta el análisis posterior. La distribución de la longitud de la secuencia muestra un signo de exclamación cuando las secuencias no presentan la misma longitud, este módulo genera un gráfico que muestra la distribución de los tamaños de los fragmentos en el archivo analizado, como se observa en la **Fig. 45B**, para algunas plataformas de secuenciación es completamente normal tener diferentes longitudes de lectura. El último módulo que presenta signo de exclamación es el de secuencias sobre representadas, este resultado muestra que existen secuencias que representan más del 0,1% del total, como se muestra en la **Fig. 45C**, encontrar una secuencia muy sobre representada en el conjunto, significa que es altamente significativo

a nivel biológico o que la librería puede estar contaminada, sin embargo, para este caso no se encontró una posible fuente.

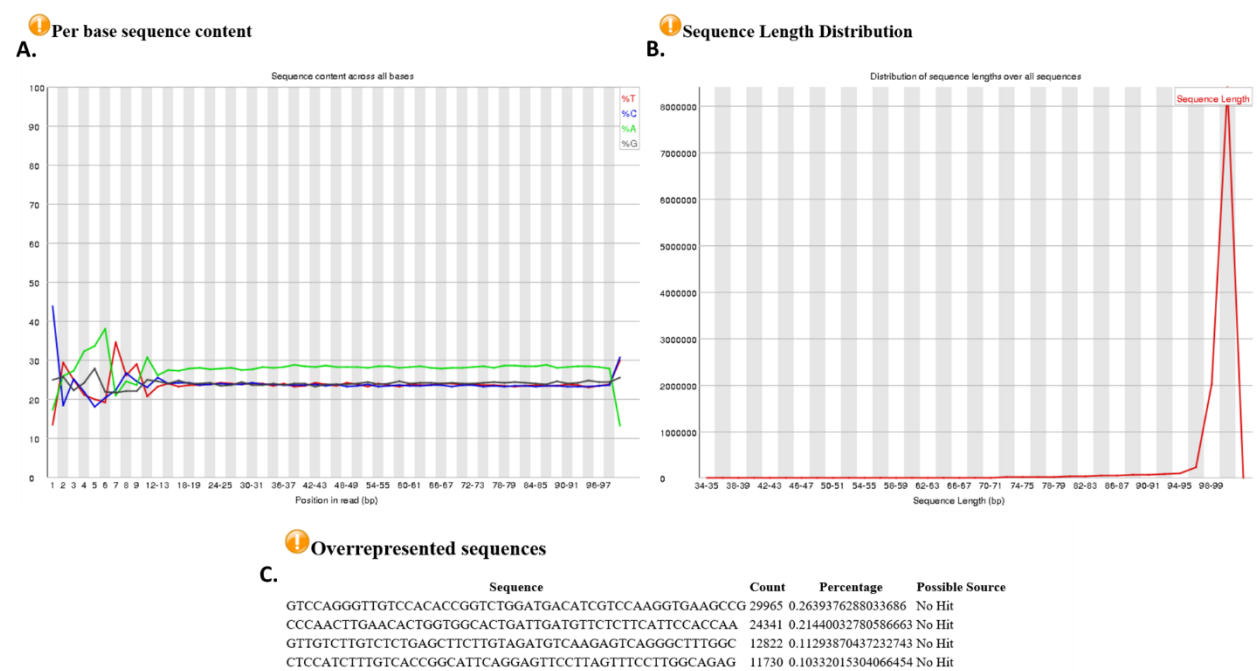


Fig. 45 Módulos del análisis con FastQC que presentan signo de exclamación. **A.** Resultado del módulo del contenido de pares de bases de la secuencia, donde el color rojo representa el contenido de timina, el color azul de citosina, el color verde de adenina y el color gris de guanina, se observa que al inicio de la lectura (posición en la lectura) la proporción de las bases nitrogenadas no es proporcional, porque no se encuentran las líneas paralelas. **B.** Distribución de la longitud de la secuencia, la mayoría de las secuencias tienen una longitud entre 98 y 99 pares de bases. En la gráfica C se observa que se encontraron cuatro secuencias sobre representadas y la cantidad de veces (count) que se encontró cada una de ellas.

Los módulos que aparecen con una X son solo dos, los niveles de duplicación de la secuencia y el contenido Kmer, como se observa en la **Fig. 46**. El primer módulo (**Fig. 46A**) emite un error si las secuencias no únicas representan más del 50% del total, estos duplicados pueden darse por artefactos del PCR o porque se ha agotado la diversidad de la librería y esta re-secuenciando las mismas secuencias; pero este reporte no distingue entre estos dos tipos de duplicados y el contenido Kmer (**Fig. 46B**) es otra manera de ver las secuencias sobre representadas, pero solo se analizan las secuencias cortas de 7-mer (7 bases nitrogenadas) y en este caso se observa que se encuentran al inicio y al final de cada lectura, que puede ser debido a la presencia de adaptadores; este resultado del contenido Kmer debe preocupar cuando el módulo de calidad de la secuencia por base

sea malo y se puede observar que para el análisis de las secuencias estudiadas este módulo tuvo una marca de aprobación .

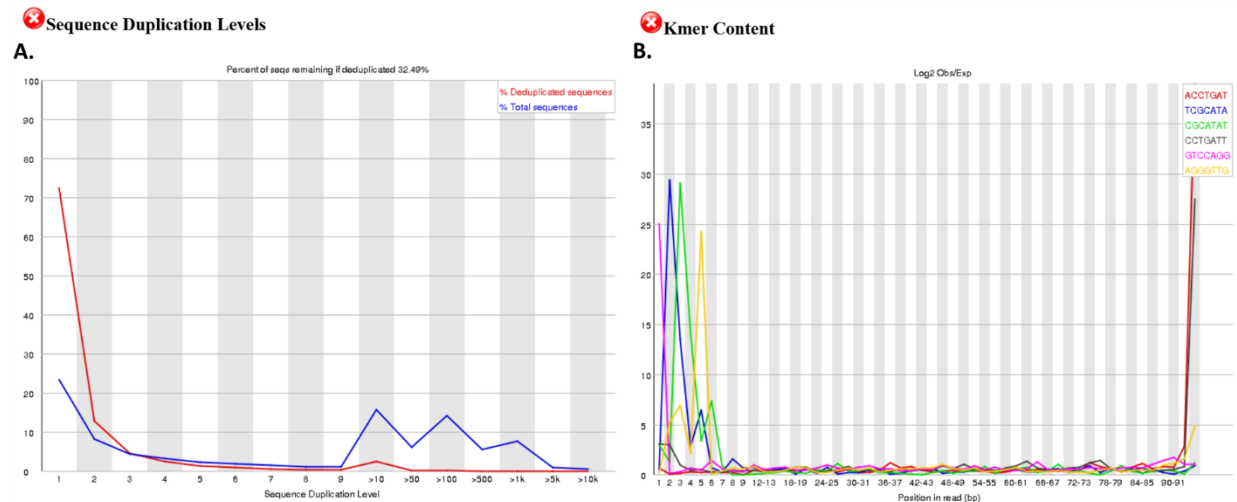


Fig. 46 Módulos del análisis con FastQC que presentan posibles fallas. A. Niveles de duplicación de la secuencia, en el trazo de color azul se muestra el total de secuencias donde solo aproximadamente 25% de las secuencias son únicas (es decir el nivel de duplicación es uno), mientras que el 75% restante (trazo de color rojo) son secuencias que se encuentran duplicadas. **B.** Contenido Kmer, en ella se encuentran seis secuencias de 7 pares de bases, que muestran el patrón de enriquecimiento de ese Kmer a través de la longitud de las lecturas.

Los resultados obtenidos anteriormente con la herramienta FastQC, fueron adecuados para ejecutar análisis posteriores con las secuencias obtenidas. De esta manera se realizó el ensamble del transcriptoma de Novo por medio de la herramienta Trinity, el resultado de este análisis, generó un archivo FASTA con todos los transcritos ensamblados y en la **Tabla 5** se muestra el total de transcritos ensamblados para cada una de las especies de estudio.

Tabla 5 Transcritos ensamblados con la herramienta Trinity

Especie	Transcritos ensamblados
<i>E. johnstonei</i>	87.062
<i>E. boulengeri</i>	77.001
<i>P. aurotaenia</i>	71.834
<i>A. minutus</i>	81.966
<i>O. histrionica</i>	85.964
<i>A. bombetes</i>	89.612
<i>C. fraterdanieli</i>	76.663

El último análisis realizado con el portal web Galaxy, fue el alineamiento de las lecturas con el ensamble obtenido anteriormente con Trinity, el cual se toma como genoma de referencia, para esto se utilizó la herramienta TopHat, el cual arrojó una tasa de mapeo total de las lecturas alrededor del 90% para cada una de las especies de estudio.

6.1.2.2. Secuencias de ADNc que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las especies de estudio

En la base de datos NCBI se buscaron las secuencias completas de ADNc o ARNm que codifican para la subunidad α de los Nav de vertebrados como *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Danio rerio* y *Thamnophis sirtalis*, se encontró que la longitud de estas secuencias iba entre 5553 y 6957 pb; parámetro que se tuvo en cuenta para la búsqueda de las secuencias de ADNc que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las especies de estudio, pero debido a que los transcritos ensamblados pueden tener una longitud mayor, ya que no se ha definido el marco abierto de lectura, se tomó como longitud mínima de búsqueda 6000 pb y como longitud máxima 8000 pb; estos dos parámetros, junto con el archivo FASTA generado con los transcritos ensamblados, fueron cargados en el algoritmo creado con el software Qt Creator. Este resultado generó un archivo FASTA solo con los transcritos ensamblados que se encontraran dentro del rango de longitud establecido, de igual manera se reportó el número de secuencias encontradas en ese rango para cada una de las especies de estudio, como se puede observar en la **Tabla 6**.

Tabla 6 Transcritos de cada una de las especies con una longitud entre 6000 y 8000 pb.

Especie	Transcritos entre 6000 y 8000 pb
<i>E. johnstonei</i>	343
<i>E. boulengeri</i>	175
<i>P. aurotaenia</i>	140
<i>A. minutus</i>	182
<i>O. histrionica</i>	162
<i>A. bombetes</i>	299
<i>C. fraterdanieli</i>	224

El archivo FASTA con los transcritos filtrados a la longitud establecida, de cada una de las especies de estudio, fue cargado en la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI; de esta manera se identificó el transcrito con la mayor similitud a las secuencias reportadas en las bases de datos que codifican para Nav. Es decir, se obtuvo la secuencia de ADNc que codifica para la subunidad α del Nav1.4 de cada uno de los seis dendrobátidos; para la especie control *Eleutherodactylus johnstonei*, se encontró la secuencia de ADNc de la subunidad α del Nav en el rango de longitud entre 8000 y 9000 y no entre 6000 y 8000 como en el resto de las secuencias de estudio.

6.1.2.3. ORF de las especies de estudio

La secuencia de ADNc que codifican para la subunidad α del Nav de músculo esquelético de cada una de las especies de estudio, fue cargada en formato FASTA en la herramienta ORFfinder; el resultado obtenido para la secuencia de *P. aurotaenia* se muestra en la **Fig. 47**, donde se observa los ORF's encontrados, la longitud de cada uno de ellos en pares de bases y en residuos y al lado inferior izquierdo se obtiene la traducción a proteína y al darle clic en el botón SmartBLAST, se obtiene con que secuencia reportada en las bases de datos es más parecido el ORF, como se observa en la **Fig. 48**.

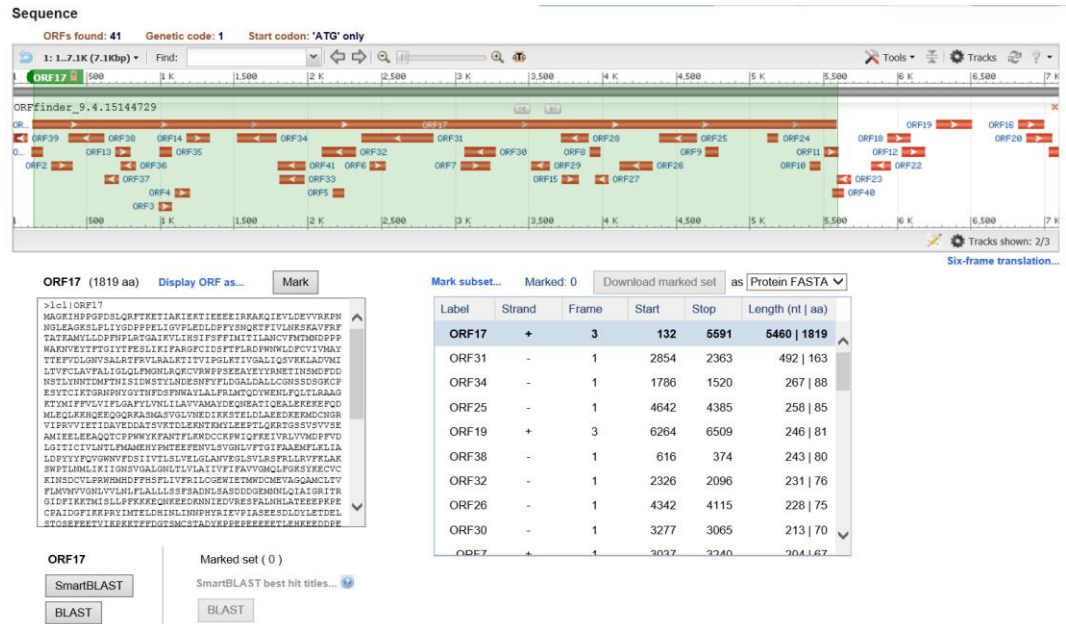


Fig. 47 ORF's encontrados para la secuencia de *Phyllobates aurotaenia*.

Best hits

Select: All None Selected:0

Alignments GenPept

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	sodium channel protein type 4 subunit alpha [Mus musculus]	2709	2709	99%	0.0	74%	NP_573462.2
<input type="checkbox"/>	sodium channel protein type 4 subunit alpha [Homo sapiens]	2670	2670	99%	0.0	74%	NP_000325.4
<input type="checkbox"/>	sodium channel protein type 4 subunit alpha A [Danio rerio]	2513	2513	98%	0.0	70%	NP_001034914.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: sodium channel protein type 4 subunit alpha A isoform X2 [Danio rerio]	2511	2511	98%	0.0	70%	XP_017213969.1
<input type="checkbox"/>	sodium channel protein type 4 subunit alpha A isoform X1 [Danio rerio]	2509	2509	98%	0.0	70%	XP_017213968.1

Fig. 48 Resultado obtenido del SmartBLAST para el ORF17 de la figura anterior.

En la **Tabla 7** se encuentra consignada la longitud de cada uno de los ORF's encontrados que corresponden a la secuencia de Nav de cada una de las especies de estudio.

Tabla 7 Longitud encontrada de cada una de las secuencias de Nav de las especies de estudio.

Especie	Longitud ORF	
	pb	aa
<i>E. johnstonei</i>	5463	1820
<i>E. boulengeri</i>	5463	1820
<i>P. aurotaenia</i>	5460	1819
<i>A. minutus</i>	5463	1820
<i>O. histrionica</i>	5367	1788
<i>A. bombetes</i>	5463	1820
<i>C. fraterdanieli</i>	5463	1820

6.1.2.4. Alineamiento y caracterización de la estructura primaria que codifica para la subunidad α de los Nav1.4 de las especies de estudio

El resultado del alineamiento múltiple de las seis especies de estudio, de la especie control *E. johnstonei*, de la secuencia de Nav de músculo esquelético de *P. aurotaenia* obtenida en la tesis de Doctorado del Santiago Castaño y la secuencia de Nav de músculo esquelético de rata encontrada en las bases de datos, se muestra desde la **Fig. 49A** hasta la **Fig. 49D**, en estas imágenes también se señalan los cuatro dominios homólogos, los seis segmentos transmembrana de cada uno de los dominios, el filtro de selectividad DEKA y el segmento de inactivación IFM, típicos de los Nav. Para esquematizar la posible distribución de los aminoácidos lipofílicos e hidrofílicos en estructura secundaria, como ejemplo se tomó la secuencia primaria de la subunidad α del Nav de *P. aurotaenia* obtenida en este proyecto y se realizó una predicción de su estructura secundaria por medio de la herramienta Web Protter y como se muestra en la **Fig. 50**.

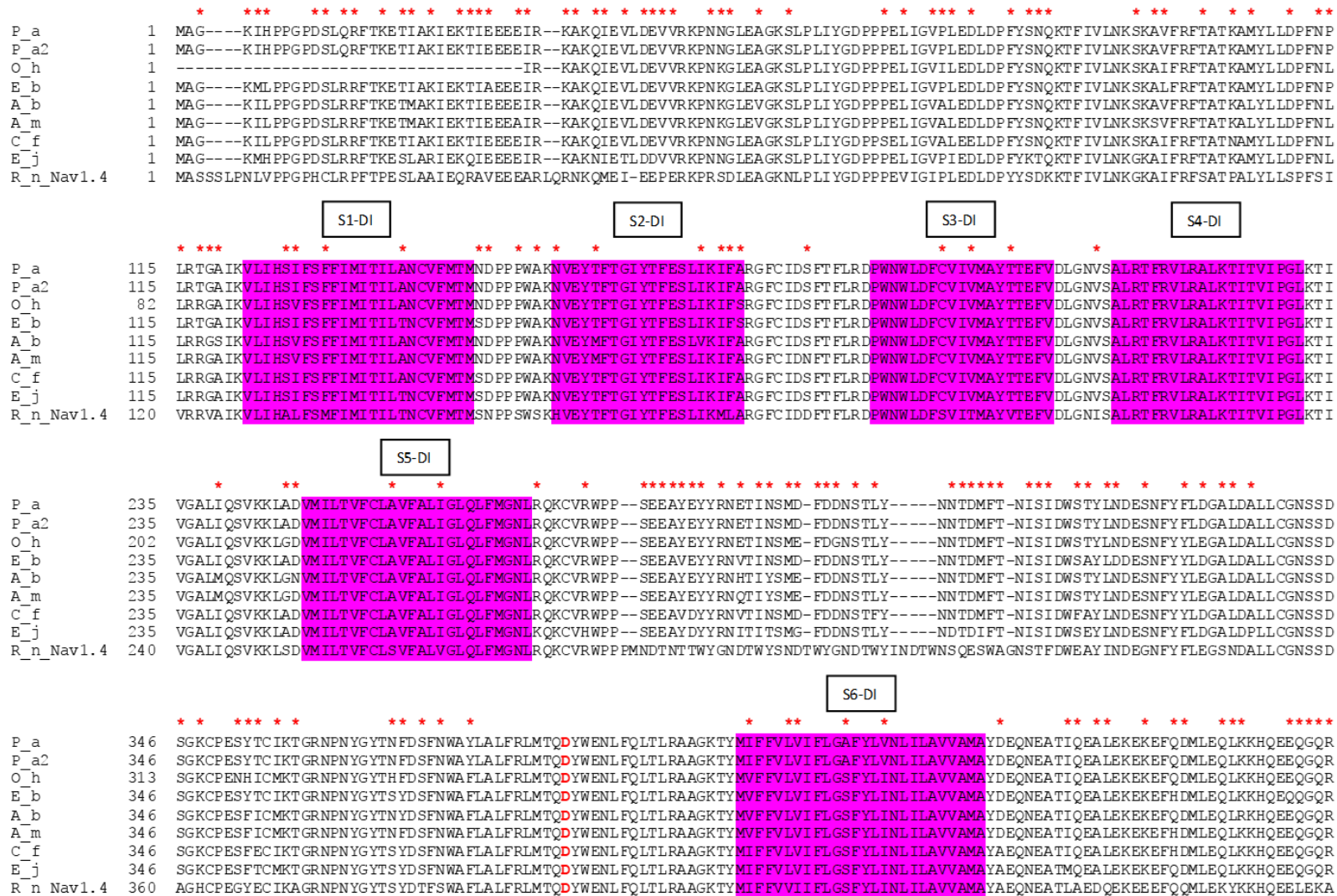


Fig. 49 A. Alineamiento múltiple de la estructura primaria de los Nav1.4 de las seis especies de estudio, de *E. johnstonei*, de *R. norvegicus* y de *P. aurotaenia2* (secuencia tomada de la tesis Doctoral de Santiago Castaño 2011), desde el residuo 1 hasta el 465. Los segmentos transmembrana del dominio I están resaltados en color púrpura. En color rojo está resaltado el residuo D que conforman el filtro de selectividad DEKA. En * se muestran los residuos variables. P_a: *Phyllobates aurotaenia*, P_a2: *Phyllobates aurotaenia2*, O_h: *Oophaga histrionica*, E_b: *Epipedobates boulengeri*, A_b: *Andinobates bombetes*, A_m: *Andinobates minutus*, C_f: *Colostethus fraterdanieli*, E_j: *Eleutherodactylus johnstonei* y R_n_Nav1.4: *Rattus norvegicus* Nav1.4.

De los resultados obtenidos en este capítulo se encontraron las secuencias completas que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de los dendrobátidos de estudio y de la especie control *E. johnstonei*, cuyos pesos moleculares son aproximadamente de 208.8 KDa (dato estimado mediante el software Geneious), valor un poco menor a 260KDa, que es el peso molecular reportado para mamíferos (Beneski and Catterall 1980).

Las longitudes de las subunidades α encontradas presentan una longitud aproximada de 1820 residuos y la organización de los residuos coinciden con lo reportado por Catterall en el 2000, es decir una estructura característica con cuatro dominios homólogos, seis segmentos transmembrana cada dominio, donde los cuatro primeros segmentos transmembrana forman el sensor de voltaje (S1-S4), los segmentos S4 presentan entre cuatro y ocho residuos cargados positivamente y los otros dos segmentos (S5-S6) forman el poro del canal.

En el poro, específicamente en los segmentos S6 de los cuatro dominios se conservan el motivo de la bisagra "GGGS" ("G" en S6DI, "G" en S6DII, "G" en S6DIII y "S" en DIVS6) de la compuerta de activación del canal, los cuales brindan flexibilidad y son esenciales en la apertura y cierre del canal (Zhao et al. 2004).

Las secuencias obtenidas muestran conservado el filtro de selectividad DEKA (Heinemann et al. 1992) (Lipkind and Fozzard 2008), encontrado en el bucle P en las siguientes posiciones D386 (Dominio I), E780 (Dominio II), K1253 (Dominio III) y A1545 (Dominio IV).

En el bucle intracelular entre el segmento S6 del dominio III y el segmento S1 del dominio IV del canal, se identificó el motivo hidrofóbico IFM, absolutamente conservado en sus residuos y posiciones específicas (I1319, F1320 y M1321) para todas las especies de estudio, responsable de la inactivación rápida (Vassilev, Scheuer, and Catterall 1988).

De la misma manera en este proyecto se identificaron bucles extracelulares relativamente grandes en cada dominio, conectando los segmentos transmembrana S5 y S6 al bucle reentrante en la membrana, bucles intracelulares conectando los cuatro dominios homólogos e igualmente se identificaron los extremos amino y carboxilo terminal intracelulares (Catterall 2000)

Por lo anterior se puede sugerir que los mecanismos funcionales relacionados con los dominios, segmentos y residuos expuestos deberían estar conservados si estos canales son comparados con el Nav1.4 de rata.

6.1.3. Conclusiones Capítulo I

- Se encontraron siete nuevas secuencias completas que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 que no han sido reportadas en las bases de datos de genes.
- La longitud de la secuencia del Nav1.4 de las especies *E. johnstonei*, *E. boulengeri*, *A. minutus*, *A. bombetes* y *C. fraterdanieli* es de 1820 aminoácidos; de la especie *P. aurotaenia* es de 1819 aminoácidos y de la especie *O. histrionica* es la más corta con 1788 aminoácidos.
- Las secuencias primarias completas de Nav1.4 de las especies de dendrobátidos estudiadas en este trabajo son altamente conservadas y comparten una similitud de 69,1% con la secuencia de Nav1.4 de rata (*Rattus Norvegicus*).
- La secuencia de Nav1.4 de la especie de estudio *P. aurotaenia*, presenta una similitud del 100% con la secuencia de Nav1.4 de *P. aurotaenia2* reportada en la tesis de doctorado de Santiago Castaño en el año 2011, a pesar de que esta última fue obtenida por la técnica de transcripción reversa.
- Cada una de las secuencias de Nav1.4 de las seis especies de estudio y de la especie control *E. johnstonei*, comparten una similitud entre 73% y 74% con la secuencia de Nav1.4 de *Rattus norvegicus*.
- La especie control *E. johnstonei*, a pesar de no pertenecer a la familia Dendrobatidae a la que pertenecen el resto de las especies de estudio, comparte una similitud entre el 90% y el 91% con las secuencias de Nav1.4 obtenidas para cada uno de los dendrobátidos.
- Los cuatro dominios se encuentran altamente conservados entre las seis especies de dendrobátidos, la especie control *E. johnstonei* y la especie externa *R. norvegicus*, con una similitud que supera el 70%, siendo el dominio I el menos conservado de todos con una similitud del 71,8% y el dominio II el más conservado con una similitud del 88,3%.

- Los segmentos transmembrana entre las seis especies de dendrobátidos, la especie control *E. johnstonei* y la especie externa *R. norvegicus*, son altamente conservados, el segmento S2 de los cuatro dominios presenta una similitud del 73,4%, el segmento S4 presenta una similitud del 96,6%, siendo conservado completamente en los dominios I y II, el segmento S5 presenta una similitud del 100% en el dominio II y el segmento S6 que contiene residuos importantes en la unión tanto de los AL como de la BTX presenta una similitud del 86,5%.
- Los segmentos transmembrana S1, S2, S3, S5 y S6 de los cuatro dominios, de las seis especies de dendrobátidos y de la especie control *E. johnstonei*, contienen principalmente residuos hidrofóbicos, mientras que el segmento transmembrana S4 de los cuatro dominios, presentan entre cuatro y ocho residuos de Arginina (R) o Lisina (K) (residuos con carga positiva); lo que coincide con lo reportado por otros autores.
- El segmento involucrado en la inactivación rápida IFM, presente en el bucle intracelular entre el dominio III y el dominio IV está completamente conservado en todas las secuencias de Nav1.4 de las especies de estudio.
- El filtro de selectividad DEKA está 100% conservado, en todas las secuencias de Nav1.4 de las especies de estudio.
- En los bucles intra y extracelulares de las secuencias de Nav1.4 de las especies de estudio fue donde se encontraron mayores divergencias
- De los extremos, el N-terminal es el menos conservado entre las secuencias de Nav1.4 de las seis especies de dendrobátidos, la especie control *E. johnstonei* y la especie externa *R. norvegicus*, con una similitud del 51,2%, mientras que el C-terminal presenta una similitud del 70,6%.

6.2. CAPITULO II: Comparación de las secuencias primarias completas, dominios y motivos funcionales y estructurales por medio de árboles filogenéticos e identificación de residuos involucrados en inactivación rápida y lenta de los Nav1.4 de las especies de estudio

Para cumplir con el objetivo dos, en este capítulo fueron comparadas las secuencias primarias completas y parciales que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las seis especies de dendrobátidos, la secuencia de *P. aurotaenia* de la tesis doctoral de Santiago Castaño, la secuencia de la rana control *E. johnstonei* y la secuencia de la especie externa *R. norvegicus*; empleando un algoritmo para la construcción de árboles filogenéticos. En los resultados se expone el análisis que arroja el árbol para las secuencias completas, como también los árboles para cada uno de los cuatro dominios, los extremos carboxilo y amino terminales, los segmentos que conforman el poro y los bucles hidrofílicos. Igualmente se diseñó por medio de la herramienta Web Protter, una imagen de la estructura primaria del Nav con los residuos involucrados en los estados de inactivación rápida e inactivación lenta, presentes en los dominios y motivos funcionales y estructurales, mencionados anteriormente.

6.2.1. Árbol filogenético de la secuencia primaria completa de los Nav1.4

A continuación, se muestra el árbol filogenético (**Fig. 51**) diseñado a partir del algoritmo RAxML usando el método de Máxima Verosimilitud, construido con el fin de evaluar las similitudes entre las secuencias primarias que codifican para la subunidad α de los Nav1.4 de las seis especies de dendrobátidos, la secuencia primaria de Nav1.4 de la especie control *E. johnstonei* y la secuencia primaria de Nav1.4 de la especie externa *R. norvegicus*.

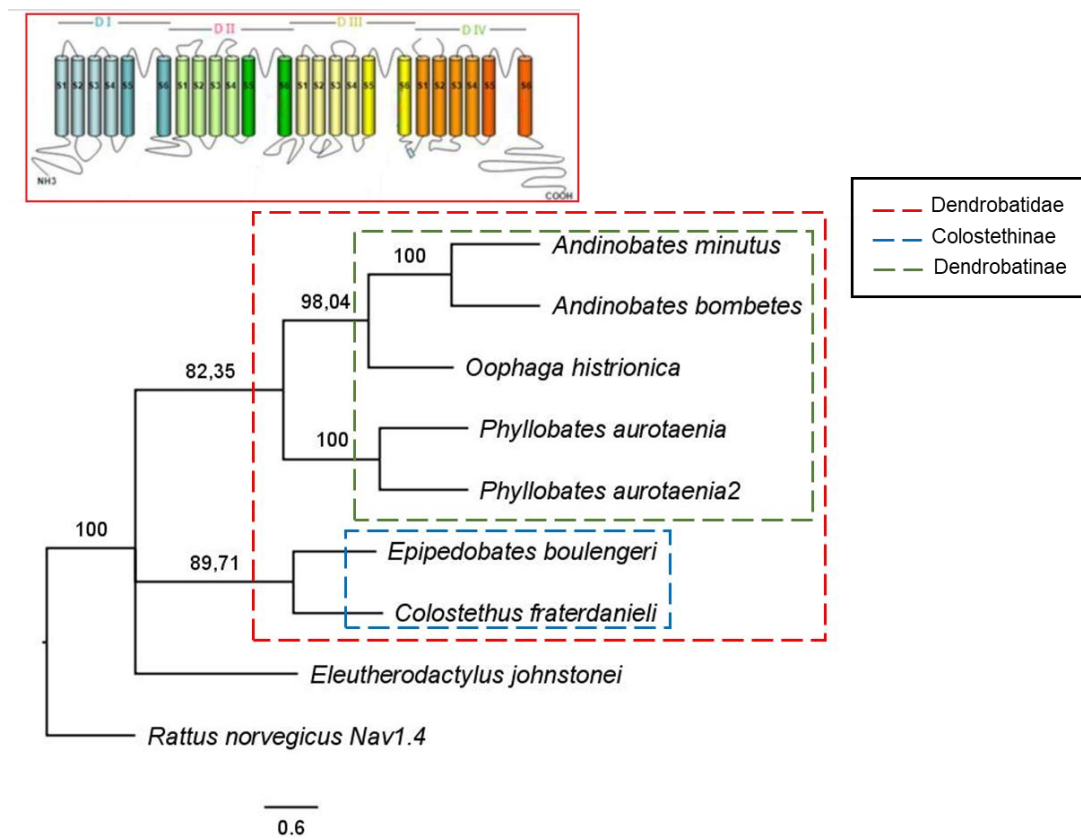


Fig. 51 *Árbol filogenético de la secuencia completa de los Nav1.4.* Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones). Se muestra la familia Dendrobatidae con dos subfamilias Colostethinae y Dendrobatinae.

En el árbol filogenético mostrado en la **Fig. 51** se pueden observar dos grandes clados uno formado por la especie externa *R. norvegicus* (P15390 UniProtKB) y otro formado por las especies de estudio, este último clado, se subdivide a su vez en tres clados más; uno formado por la especie control *E. johnstonei*, el otro incluye dos especies *E. boulengeri* y *C. fraterdanieli* y el último clado incluye las especies *P. aurotaenia*, *O. histrionica*, *A. bombetes* y *A. minutus*. La robustez de los datos fue confirmada por el alto valor de bootstrap en todos los nodos del árbol.

De la misma manera, en el árbol filogenético de la secuencia completa de Nav (**Fig. 51**), se pueden observar dos subfamilias dentro de la familia Dendrobatidae, la subfamilia Colostethinae, donde se encuentran las especies *C. fraterdanieli* y *E. boulengeri* y la subfamilia Dendrobatinae, donde se encuentran las especies *P. aurotaenia*, *O. histrionica*, *A. bombetes* y *A. minutus*; claramente se puede evidenciar la similitud con el clado de la familia Dendrobatidae del árbol reportado por Grant *et al.* 2006, mostrado en la **Fig. 52**, cabe aclarar que en este árbol no se incluye el género *Andinobates* que hace parte también de la subfamilia Dendrobatinae.

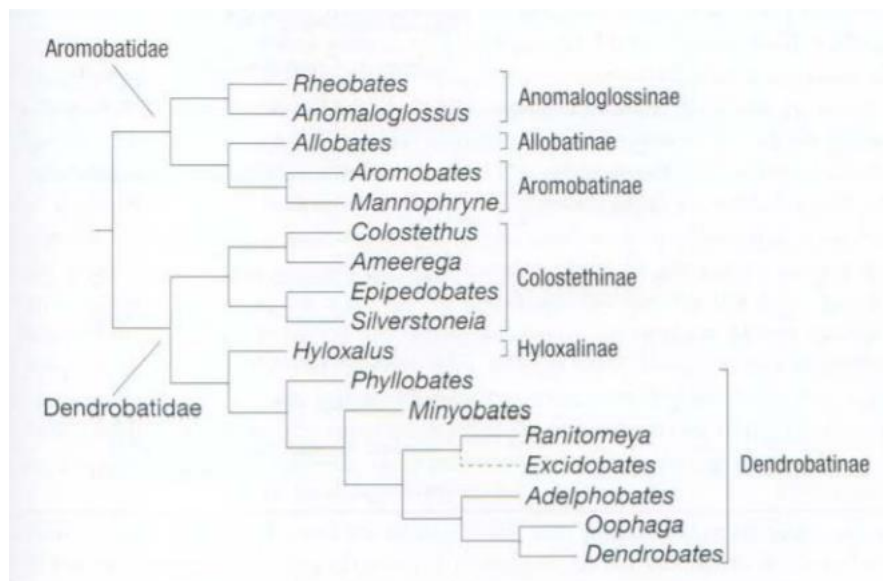


Fig. 52 Relaciones filogenéticas entre géneros de la superfamilia Dendrobatoidea. Relaciones basadas en más de 1.55 millones de pares de bases de ADN mitocondrial y nuclear de 11 genes Grant *et al.* (2006)(Kahn *et al.* 2016)

Del alineamiento obtenido y del diseño del árbol filogenético, se encontró que: Las especies que presentan alta similitud en su secuencia completa son *E. boulengeri* y *C. fraterdanieli* con una similitud del 97,3% y *A. minutus* y *A. bombetes* con una similitud del 98,7% y la especie que presenta más similitud con la especie externa es *C. fraterdanieli*.

6.2.2. Árboles filogenéticos y residuos involucrados en inactivación rápida y lenta de los cuatro dominios homólogos de los Nav1.4

6.2.2.1. Árbol filogenético del dominio I

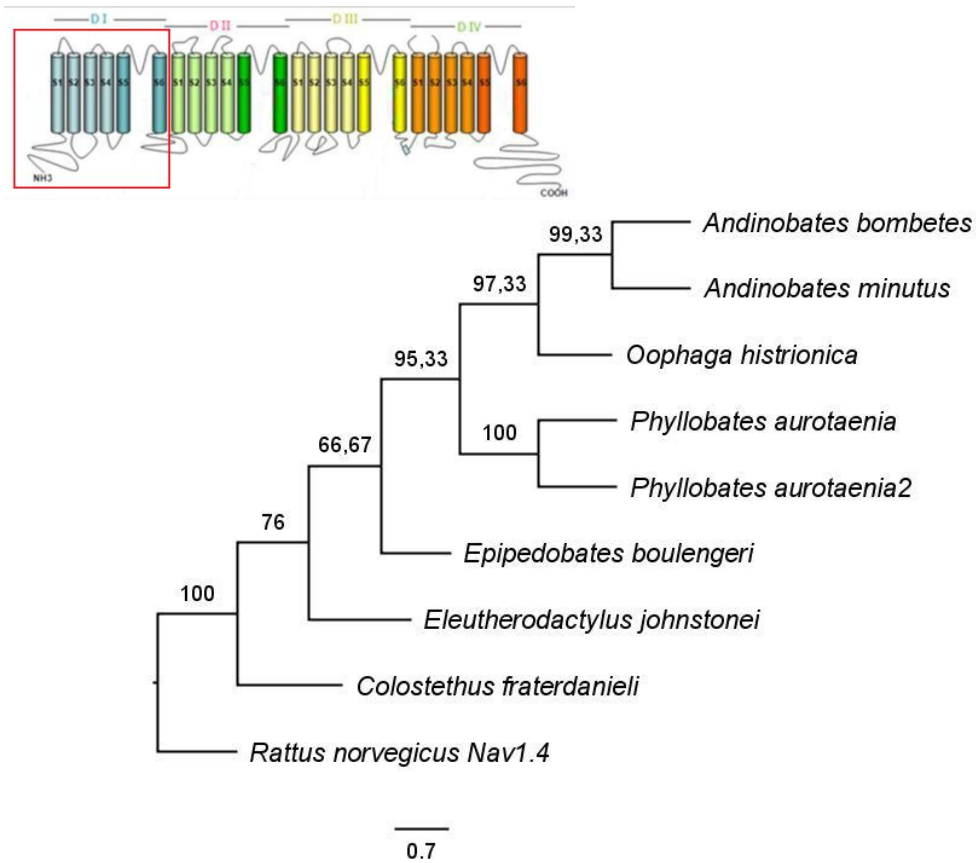


Fig. 53 Árbol filogenético del dominio I de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (150 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 53** se encontró que:

- El dominio I contiene 319 residuos de aminoácidos, de los cuales 229 residuos se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y la especie externa, lo que representa una similitud del 71,8%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 277 residuos conservados de los 319, es decir una similitud del 89,4%.
- En el dominio I, se presenta una alta similitud del 78,4% entre *C. fraterdanieli* y la especie externa.
- Las especies *A. bombetes* y *A. minutus* presentan una alta similitud del 98,4% en el dominio I
- La especie que presenta más diferencias en el dominio I, con respecto a la especie externa es *A. bombetes*, con una similitud de 75,2%.

6.2.2.2. Árbol filogenético del dominio II

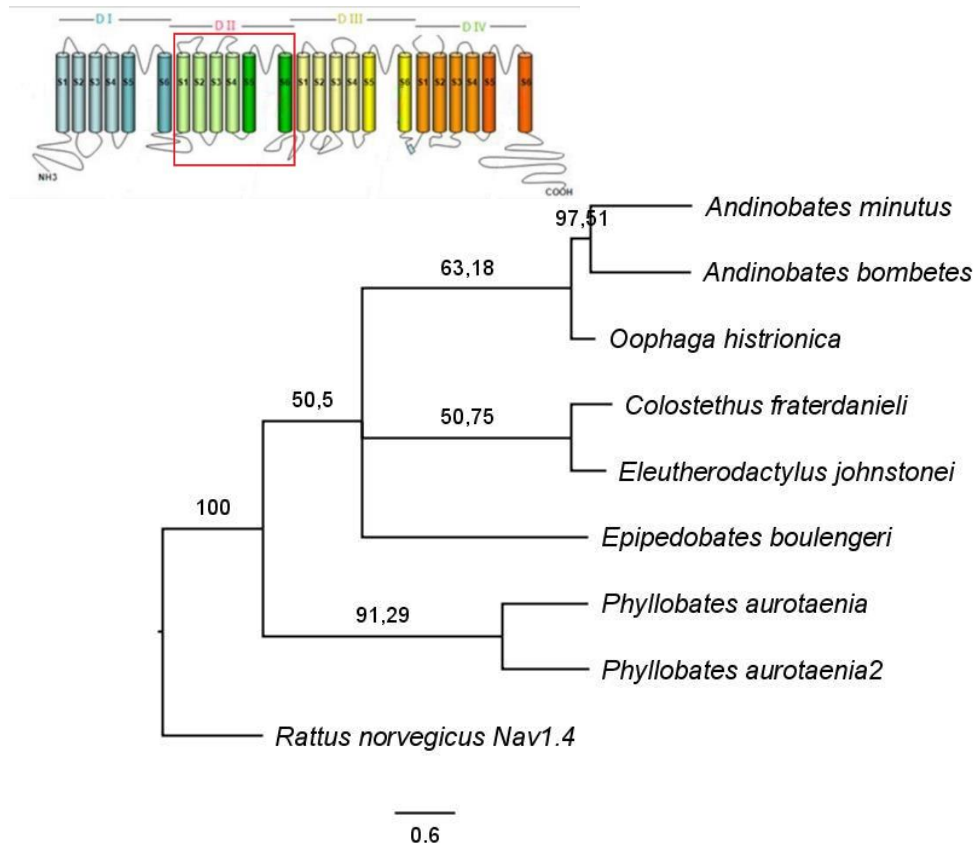


Fig. 54 Árbol filogenético del dominio II de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (402 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 54** se encontró que:

- El dominio II contiene 230 residuos, de los cuales 203 residuos se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y la especie externa, lo que representa una similitud del 88,3%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 217 residuos conservados de los 230, es decir una similitud del 94,3%.

- En el dominio II, se presenta una alta similitud del 93,5% entre *P. aurotaenia* y la especie externa *R. norvegicus*.
- La especie que presenta más diferencias en el dominio II, con respecto a la especie externa es *A. minutus*, con una similitud de 91,3%.
- *A. bombetes* y *A. minutus* presentan una alta similitud del 99,6% en el dominio II.
- *C. fraterdanieli* y *E. johnstonei* también presentan una alta similitud del 96,1% en el dominio II.

6.2.2.3. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el dominio II

En el dominio II se han reportado dos residuos involucrados con patologías que afectan la inactivación lenta, presentes en el segmento transmembrana S5 y en el segmento de unión entre el segmento S4 y S5 (residuos en color amarillo en la **Fig. 55**); tres residuos involucrados con la inactivación rápida, ubicados en el segmento de unión entre el segmento S4 y S5 (residuos en color verde en la **Fig. 55**) y tres residuos relacionados con la inactivación lenta, presentes en el segmento de unión entre el segmento S5 y S6 y en el segmento S6 (residuos en color púrpura en la **Fig. 55**), los cuales serán discutidos más adelante cuando se muestren los resultados de los segmentos formadores del poro del dominio II.

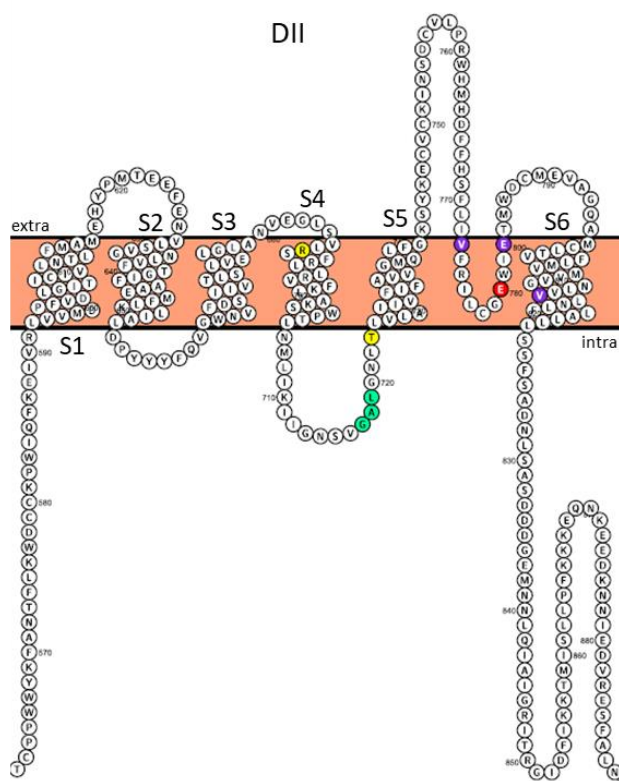


Fig. 55 Estructura primaria de los seis segmentos transmembrana del dominio II de *P. aurotaenia*. En color amarillo se muestran los residuos involucrados con patologías que afectan la inactivación lenta, en color verde los residuos que están involucrados en la inactivación rápida, en color rojo se muestra el residuo E, que conforma el filtro de selectividad DEKA y en color púrpura se señalan los residuos involucrados en inactivación lenta. Los residuos en color amarillo, verde, rojo y púrpura son conservados en las especies de dendrobátidos de estudio y en la rana control *E. johnstonei*, a excepción del residuo en color púrpura V773.

En la **Fig. 55**, en color amarillo se señalan los residuos involucrados en dos enfermedades hereditarias del músculo esquelético, que afectan la inactivación lenta (Ulbricht 2005), por un lado está la parálisis periódica hipocalémica (HypoPP-2, por sus siglas en ingles), trastorno caracterizado por episodios de parálisis muscular, acompañado de una disminución en los niveles de potasio en sangre y por otro lado está la parálisis periódica hipercalémica (HyperPP, por sus siglas en ingles), trastorno caracterizado por episodios de debilidad muscular, acompañado de un aumento en los niveles de potasio en sangre. Algunos casos de HypoPP-2 se han asociado con la mutación del residuo R669H ubicado en S4 del Nav de músculo esquelético de humano, (correspondiente al residuo R688 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*), se ha reportado por Struyk y colaboradores en el año 2000 que esta mutación no afecta la inactivación rápida, pero prolonga la recuperación de la inactivación lenta. Mientras que la mutación del residuo T698M en Nav1.4 de rata (correspondiente al residuo T723 en las especies de dendrobátidos y en *E.*

johnstonei) está asociada con HyperPP, Cummins y Sigworth en 1996 reportaron que esta mutación lleva a una rápida recuperación de la inactivación lenta. Se puede observar que en las especies de estudio no se observan estas mutaciones en ninguno de los dos residuos, permaneciendo conservados.

Smith y Goldin en 1997 quisieron evaluar la interacción entre el segmento de unión del segmento S4 y S5 del dominio II y la inactivación del canal de sodio, para ello realizaron mutaciones en los residuos G789Q, A880Q y L881Q de Nav1.2 de rata (correspondientes a los residuos G717, A718, L719 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*), mostrados en color verde en la **Fig. 55**; encontrando que estas mutaciones inactivan de manera más lenta el canal; los resultados de este estudio muestran que estos tres residuos se encuentran conservados en todas las especies de estudio.

6.2.2.4. Árbol filogenético del dominio III

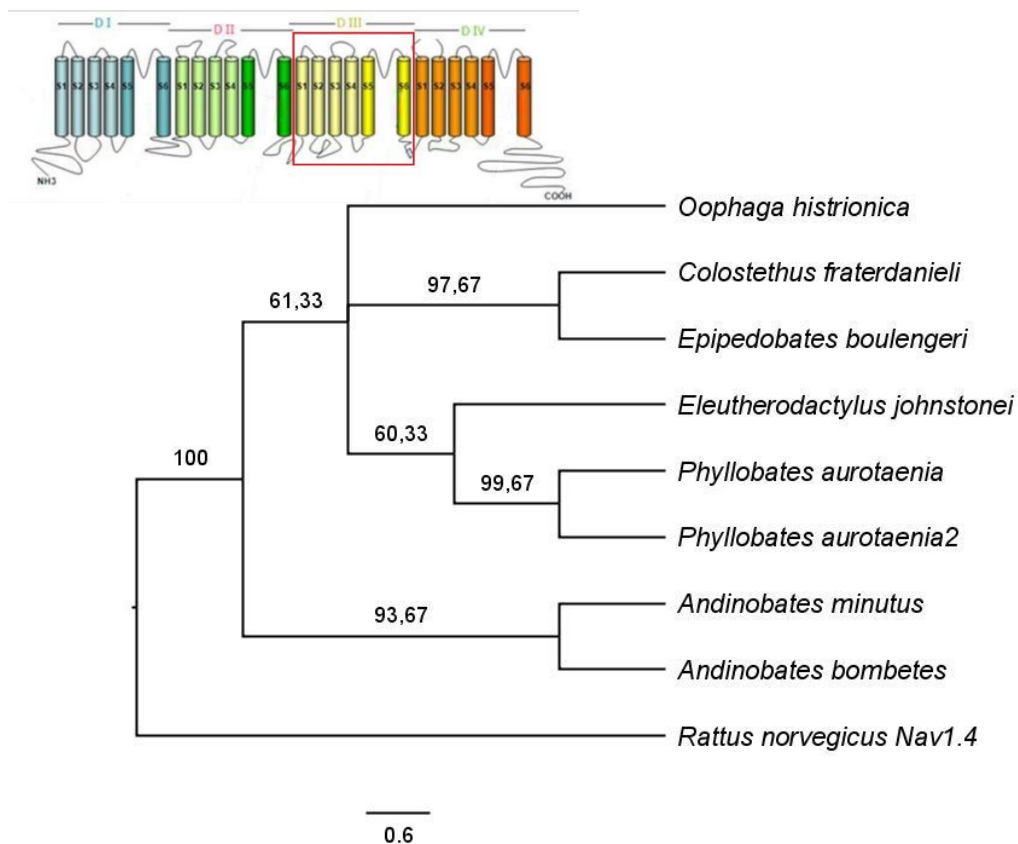


Fig. 56 Árbol filogenético del dominio III de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (300 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 56** se encontró que:

- El dominio III contiene 269 residuos, de los cuales 226 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 84%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 252 residuos conservados de los 269, es decir una similitud del 93,7%.
- En el dominio III, se presenta una alta similitud del 88,8% entre *A. bombetes*, *A. minutus* y la especie externa *R. norvegicus*.
- La especie que presenta más diferencias en el dominio III, con respecto a la especie externa es *C. fraterdanieli* y *O. histrionica* con una similitud de 87,7%.
- *E. boulengeri* y *C. fraterdanieli* presentan una alta similitud del 99,3% en el dominio III.
- *A. bombetes* y *A. minutus* también presentan una alta similitud del 99,3% en el dominio III.

6.2.2.5. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el dominio III

En el dominio III se han reportado tres residuos involucrados en la inactivación rápida, presentes en el segmento de unión entre el segmento transmembrana S4 y S5 (residuos de color verde en la **Fig. 57**); dos residuos relacionados con la inactivación lenta, presentes en el segmento de unión entre el segmento S5 y S6 (residuos de color púrpura en la **Fig. 57**), los cuales serán discutidos más adelante cuando se muestren los resultados del árbol de los segmentos formadores del poro del dominio III.

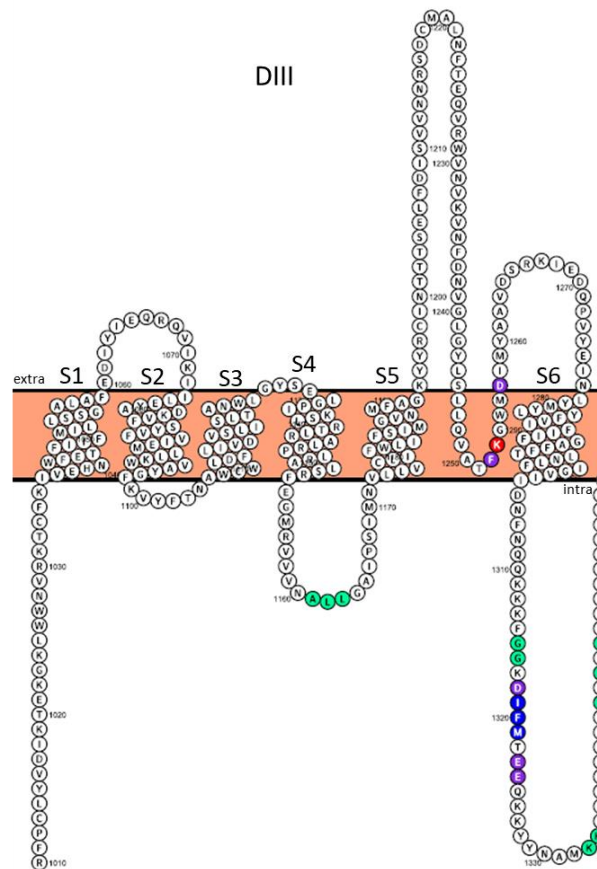


Fig. 57 Estructura primaria de los seis segmentos transmembrana del dominio III de *P. aurotaenia*. En color verde se muestran los residuos que están involucrados en la inactivación rápida, en color rojo se muestra el residuo K, que conforma el filtro de selectividad DEKA, en color púrpura se señalan los residuos involucrados en inactivación lenta y en color azul se muestra el segmento de inactivación rápida IFM que pertenece al bucle entre DIII y DIV. Los residuos en color verde, rojo, púrpura y azul son conservados en las especies de dendrobátidos de estudio y en la rana control *E. johnstonei*, a excepción del residuo en color verde L1163, que cambia en *E. johnstonei* por V1163.

Smith y Goldin en 1997 también evaluaron la interacción entre el segmento de unión del segmento S4 y S5 del dominio III y la inactivación del Nav, por medio de mutaciones en los residuos A1329Q, L1330Q y L1331Q de Nav1.2 de rata (correspondientes a los residuos A1161, L1162 y L1163 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, esta última especie presenta un cambio por una Valina (V) en la posición 1163), señalados en color verde en la **Fig. 57**, encontrando que estas mutaciones inactivan de manera más lenta el canal, con un efecto mayor al observado en las mutaciones de los residuos en el segmento de unión entre el segmento S4 y S5 del dominio II, discutidas anteriormente. Según los resultados de este proyecto, se presenta solo un cambio en los tres residuos y en solo una especie; sin embargo, cabe aclarar que el cambio es de una L1163 por una V1163, dos

residuos con características hidrofóbicas y en las mutaciones realizadas por Smith y Goldin el cambio fue por un aminoácido con características polares.

La Alanina (A) en la posición 1329 (residuo A1161 en las especies de estudio), se conserva en los canales de sodio de vertebrados e invertebrados, a excepción sólo del canal de sodio de medusa (Goldin 1995), este alto nivel de conservación es consistente con el papel crítico en algunos aspectos de la función normal del canal de Na^+ como la inactivación rápida. El residuo A1329 interactúa con F1489 (residuo presente en el segmento de inactivación IFM) a través de interacción hidrofóbica; si estos dos residuos presentaran cargas opuestas, podrían inactivarse parcialmente a través de interacciones electrostáticas y se removerá casi completamente la inactivación; estos resultados validan el modelo de “ball and chain” para la inactivación (Smith and Goldin 1997).

6.2.2.6. Árbol filogenético del dominio IV

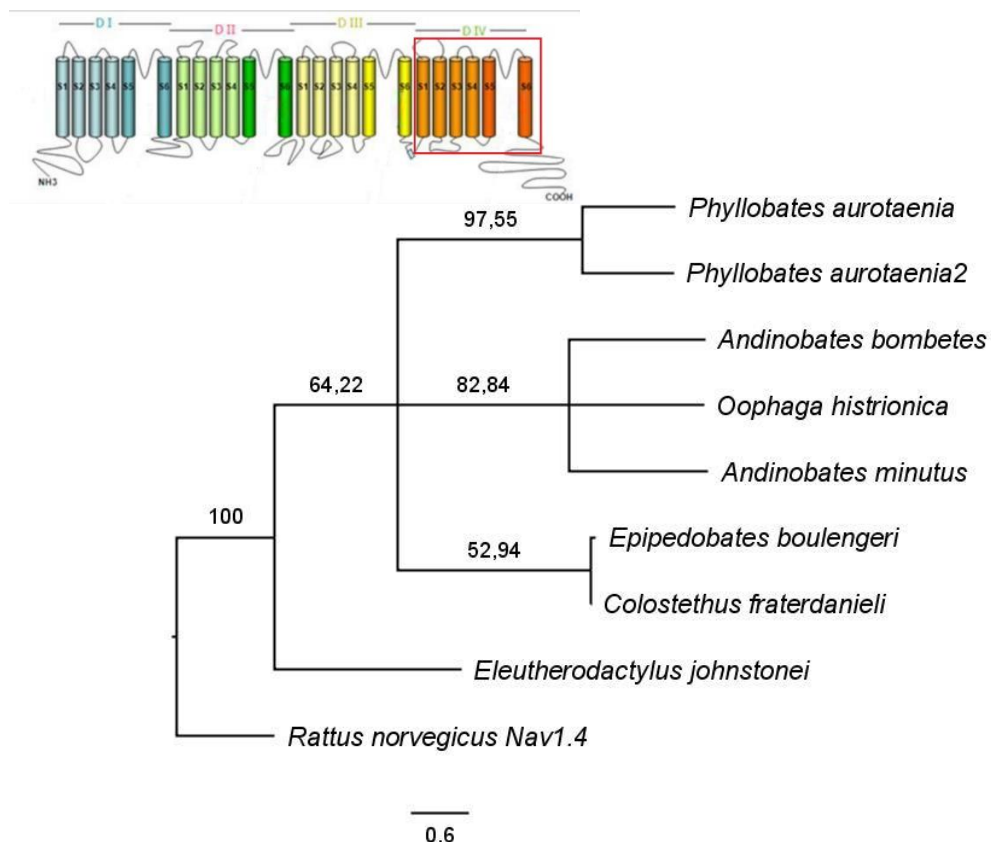


Fig. 58 Árbol filogenético del dominio IV de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 58** se encontró que:

- El dominio IV contiene 250 residuos, de los cuales 207 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 82,8%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 236 residuos conservados de los 250, es decir una similitud del 94,4%.
- En el dominio IV, se presenta una alta similitud del 87,6% entre *C. fraterdanieli*, *O. histrionica* y la especie externa *R. norvegicus*.
- La especie que presenta más diferencias en el dominio IV, con respecto a la especie externa es *P. aurotaenia* y *A. bombetes* con una similitud de 86,4%.
- *A. bombetes*, *O. histrionica* y *A. minutus* presentan una alta similitud del 98,8% en el dominio IV.
- *C. fraterdanieli* y *E. boulengeri* también presentan una alta similitud del 97,6% en el dominio IV.

6.2.2.7. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el dominio IV

En el dominio IV se han reportado ocho residuos relacionados con la inactivación rápida, presentes en el segmento S4, en el segmento de unión entre el segmento S4 y S5 y en el segmento S6 (residuos en color verde en la **Fig. 59**); dos residuos involucrados en patologías que afectan la inactivación lenta, ubicados en el segmento S4 y el segmento S6 (residuos de color amarillo en la **Fig. 59**); un residuo ubicado en el segmento de unión entre el segmento S5 y S6 involucrado con la inactivación lenta (residuo de color púrpura en la **Fig. 59**) y un residuo ubicado en el segmento S6 implicado en el sitio de unión de BTX (residuo de color naranja en la **Fig. 59**). Los residuos ubicados en el segmento S5, bucle P y en el segmento S6 serán discutidos más adelante cuando se muestren los resultados de los segmentos formadores del poro del dominio IV.

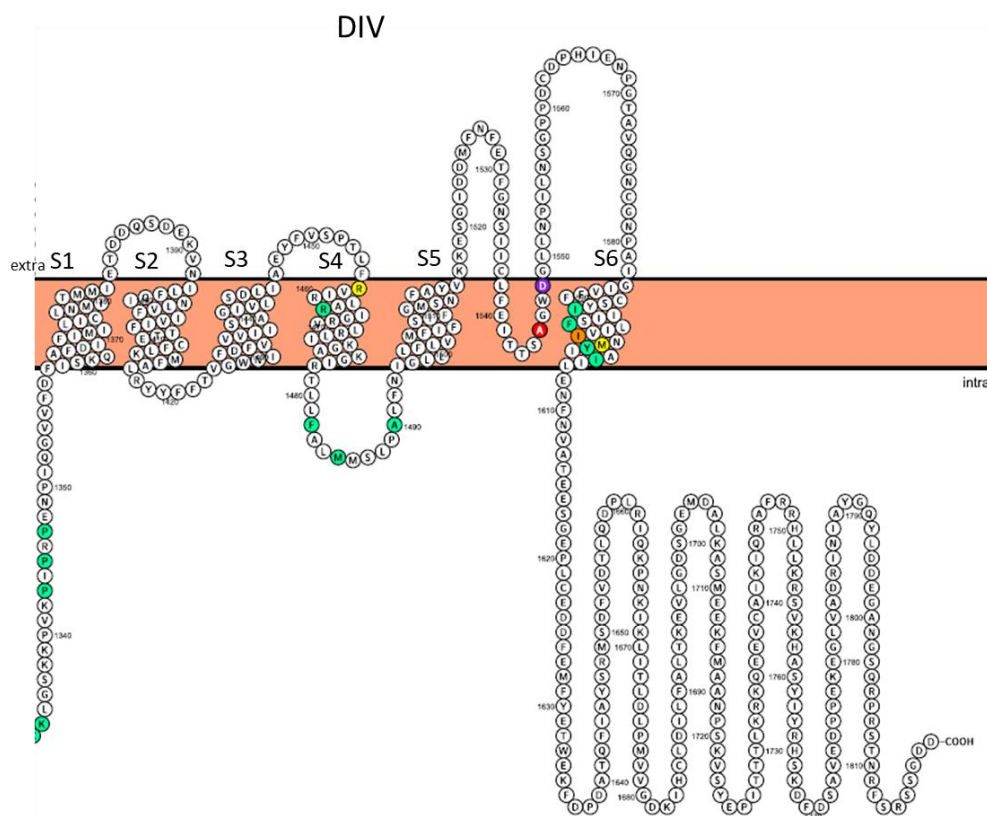


Fig. 59 Estructura primaria de los seis segmentos transmembrana del dominio IV de *P. aurotaenia*. En color verde se muestran los residuos que están involucrados en la inactivación rápida, en color rojo se muestra el residuo A, que conforma el filtro de selectividad DEKA, en color púrpura se señalan el residuo involucrado en inactivación lenta, en color amarillo se muestran los residuos involucrados con patologías que afectan la inactivación lenta y en color naranja se muestra un residuo involucrado con la acción de BTX. Los residuos en color verde, rojo, púrpura y amarillo son conservados en las especies de dendrobátidos de estudio y en la rana control *E. johnstonei*. El residuo en color naranja I1599 solo está presente en *P. aurotaenia* en las otras especies de estudio este residuo cambia por una V(Valina).

Mitrovic y colaboradores en el 2000 evaluaron la función del dominio IV en la inactivación lenta del canal de sodio y encontraron que las cargas positivas en el segmento S4 de este dominio juegan un papel importante en este tipo de inactivación, también encontraron que la sustitución por Cisteína (C) del residuo R1454 en músculo esquelético de humano (correspondiente al residuo R1463 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, residuo color verde en la **Fig. 59**), produce una marcada disminución de la velocidad de inactivación rápida. El resultado del estudio realizado por Mitrovic y colaboradores plantea que es probable que exista una interacción entre la inactivación rápida y lenta en D4S4. En los resultados de este proyecto se observa que este segmento está altamente conservado en todas las especies de estudio incluyendo la especie control *E. johnstonei*.

Al evaluar la función del segmento de unión entre el segmento S4 y S5 del dominio IV en la inactivación rápida en el Nav1.4 de humano, Lerche y colaboradores en 1997, encontraron que las mutaciones en F1473C, M1476C y A1481C (correspondientes a los residuos F1482, M1485 y A1490 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, residuos de color verde en la **Fig. 59**), disminuían la cinética de inactivación rápida. Los tres residuos que han sido considerados como un posible receptor para la partícula de inactivación rápida, permanecen conservados en todas las especies de estudio.

La enfermedad Paramyotonia congénita (PMC) es un trastorno neuromuscular caracterizado por miotonía que empeora con el ejercicio y puede ser inducida por temperaturas frías, este trastorno es causado por mutaciones en el Nav de músculo esquelético, específicamente en el residuo R1441 (correspondiente al residuo R1457 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, mostrado de color amarillo en la **Fig. 59**), Featherstone y colaboradores en 1998, encontraron que la mutación en este residuo por Prolina (P) o por Cisteína (C) en Nav1.4 de rata afectaba la inactivación lenta, sin embargo se puede observar que este residuo está conservado en todas las especies de estudio.

6.2.3. Árboles filogenéticos y predicción de estructura secundaria de los extremo amino y carboxilo terminal de los Nav1.4

6.2.3.1. Árbol filogenético del extremo amino terminal

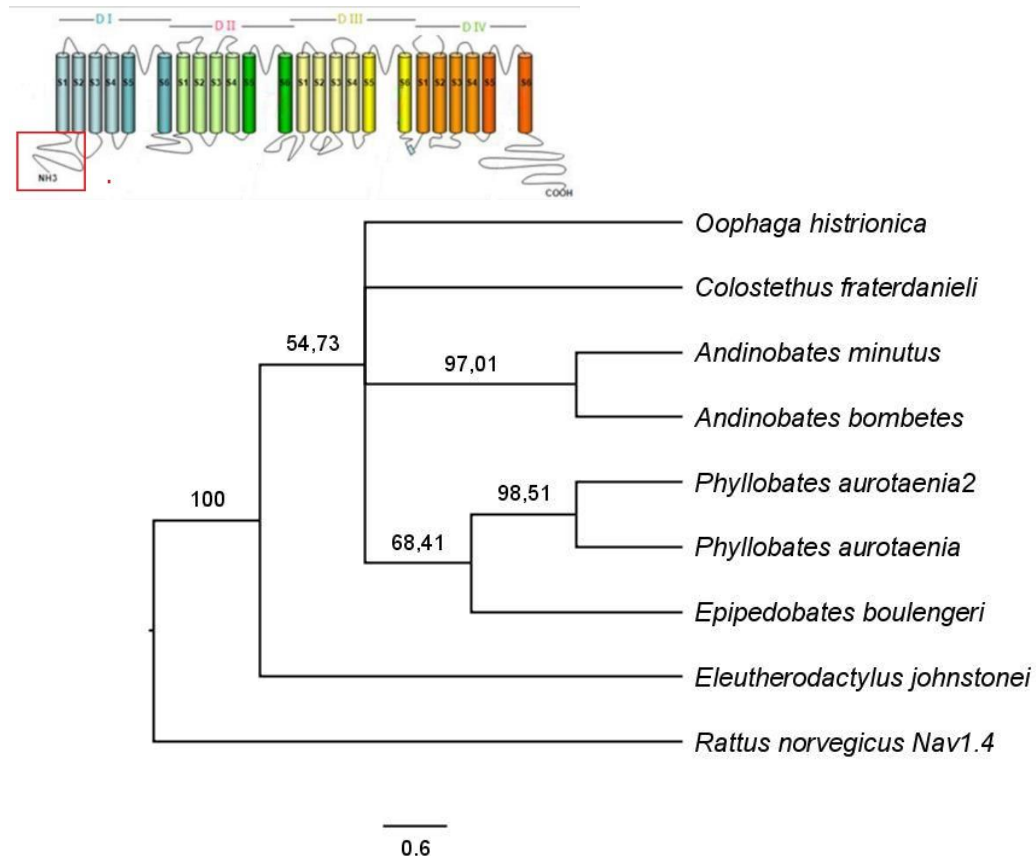


Fig. 60 Árbol filogenético del extremo amino terminal de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (402 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 60** se encontró que:

- El extremo amino terminal contiene 127 residuos, de los cuales solo 65 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 51,2%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 103 residuos conservados de los 127, es decir una similitud del 85,1%.
- La especie *E. johnstonei* es la que presenta mayor similitud en el extremo amino terminal, con la especie externa *R. norvegicus*, con una similitud del 61,4%.
- La especie que presenta más diferencias en el extremo amino terminal, con respecto a la especie externa es *A. minutus* con una similitud de 59,1%.
- *A. bombetes* y *A. minutus* presentan una alta similitud del 97,5% en el extremo amino terminal.
- *P. aurotaenia* y *E. boulengeri* también presentan una alta similitud del 95% en el extremo amino terminal.

6.2.3.2. Predicción de la estructura secundaria del extremo amino terminal

El extremo N-terminal es el menos conservado de los dos extremos en cuanto a estructura primaria, como se mencionó anteriormente en el árbol filogenético, por tanto se realizó una predicción de su estructura secundaria con el servidor CFSSP (Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server(T. Kumar 2013)), y el resultado se observa en la **Fig. 61**.

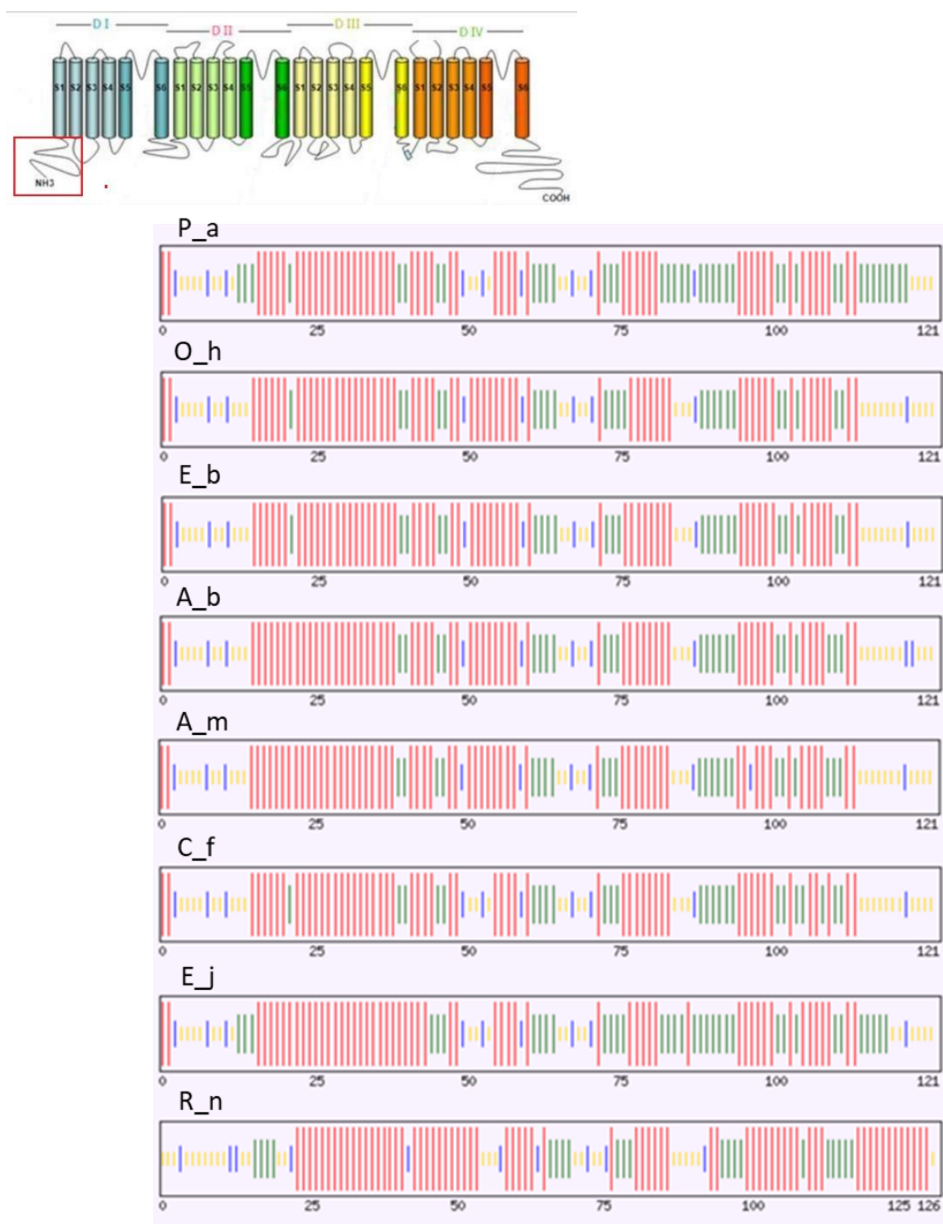


Fig. 61 Predicción de estructura secundaria del extremo N-terminal de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP. En rojo se observan las hélices alfa, en verde las hojas beta, en azul los giros y en amarillo los espirales. Los números indican la posición de cada uno de los residuos. P_a: *P. aurotaenia*, O_h: *O. histrionica*, E_b: *E. boulengeri*, A_b: *A. bombetes*, A_m: *A. minutus*, C_f: *C. fraterdanieli*, E_j: *E. johnstonei* y R_n: *R. norvegicus*.

En la predicción de estructura secundaria del extremo N-terminal (**Fig. 61**) se encontró que la proporción de hélices alfa en las especies de dendrobátidos, en la especie control *E. johnstonei* y en la especie externa *R. norvegicus* es aproximadamente igual, sin embargo la distribución de estas hélices alfa no es la misma entre las especies de dendrobátidos, incluida la especie control y la especie externa. La especie externa es la que presenta menos proporción de hojas beta. A pesar de que las especies de dendrobátidos y la especie control presentan gran similitud en la estructura secundaria del extremo N-terminal, se puede observar que *P. aurotaenia* difiere un poco en algunas partes como por ejemplo al inicio y al final de esta región.

6.2.3.3. Árbol filogenético del extremo carboxilo terminal

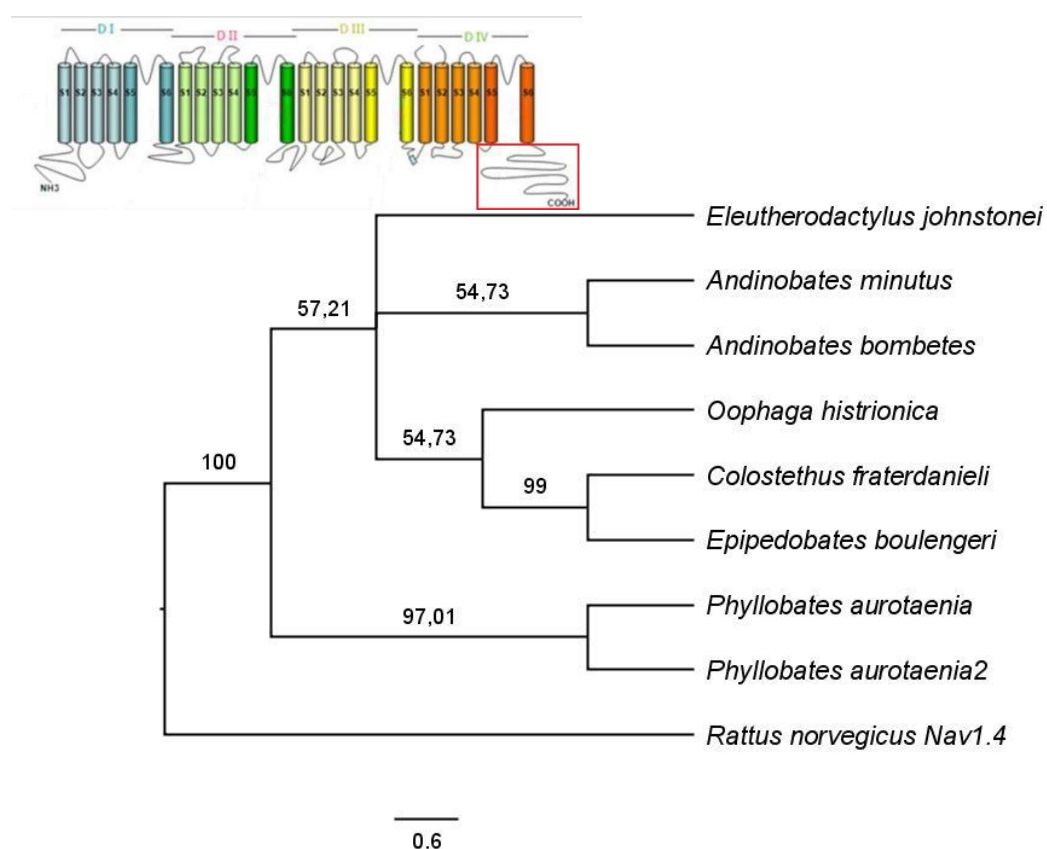


Fig. 62 Árbol filogenético del extremo carboxilo terminal de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (402 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 62** se encontró que:

- El extremo carboxilo terminal contiene 214 residuos, de los cuales 151 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 70,6%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 192 residuos conservados de los 214, es decir una similitud del 90,6%.
- La especie *P. aurotaenia* es la que presenta mayor similitud en el extremo carboxilo terminal, con la especie externa *R. norvegicus*, con una similitud del 74,8%.
- La especie que presenta más diferencias en el extremo carboxilo terminal, con respecto a la especie externa es *E. johnstonei* con una similitud de 72,4%.
- *A. bombetes* y *A. minutus* presentan una alta similitud del 99,1% en el extremo carboxilo terminal; al igual que *C. fraterdanieli* y *E. boulengeri*.

6.2.3.4. Predicción de la estructura secundaria del extremo carboxilo terminal

Se ha determinado que el dominio DIV y/o el extremo C-terminal de la subunidad α de los Nav son los responsables de las diferencias en la cinética entre el canal de sodio de corazón (Nav1.5) y de músculo esquelético de humanos (Nav1.4), donde la inactivación rápida y la recuperación de la inactivación lenta toma más tiempo para el Nav1.5 que para el Nav1.4 y que quizás esta región podría estar involucrada con la inactivación rápida de los Nav junto con el segmento de inactivación IFM (Deschênes, Trottier, and Chahine 2001). A partir de lo anterior, surgió la inquietud de determinar si existen diferencias en la estructura secundaria de esta región entre las especies de estudio incluida la especie control *E. johnstonei* y la especie externa *R. norvegicus*, por esta razón se realizó, como se observa en la **Fig. 63** una predicción de la estructura secundaria de esta región con el servidor CFSSP (Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server(T. Kumar 2013)).



Fig. 63 Predicción de estructura secundaria del extremo C-terminal de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP. En rojo se observan las hélices alfa, en verde las hojas beta, en azul los giros y en amarillo los espirales. Los números indican la posición de cada uno de los residuos. P_a: *P. aurotaenia*, O_h: *O. histrionica*, E_b: *E. boulengeri*, A_b: *A. bombetes*, A_m: *A. minutus*, C_f: *C. fraterdanieli*, E_j: *E. johnstonei* y R_n: *R. norvegicus*.

De la predicción de la estructura secundaria del extremo C-terminal se encontró por un lado que existe mayor proporción de hélices alfa en el extremo C-terminal de las especies de estudio que en el extremo C-terminal de la especie externa *R. norvegicus* y por otro

lado *P. aurotaenia* presenta una mayor proporción de espirales y ausencia de hojas beta en los últimos 12 residuos, comparado con la proporción de estas dos estructuras en las otras especies. Se plantea la hipótesis de que quizás estos hallazgos puedan estar vinculados con la relación de esta región con la inactivación rápida del canal dado que podría ser una zona que interactúa con el segmento IFM. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis es necesario realizar experimentos funcionales posiblemente evidenciados con mutación sitio-dirigida y quimerización intercambiando segmentos con otros de los canales.

6.2.4. Árboles filogenéticos, predicción de estructura secundaria y residuos involucrados en inactivación rápida y lenta de los bucles que unen cada uno de los dominios de los Nav1.4

6.2.4.1. Árbol filogenético del bucle entre el dominio I y II

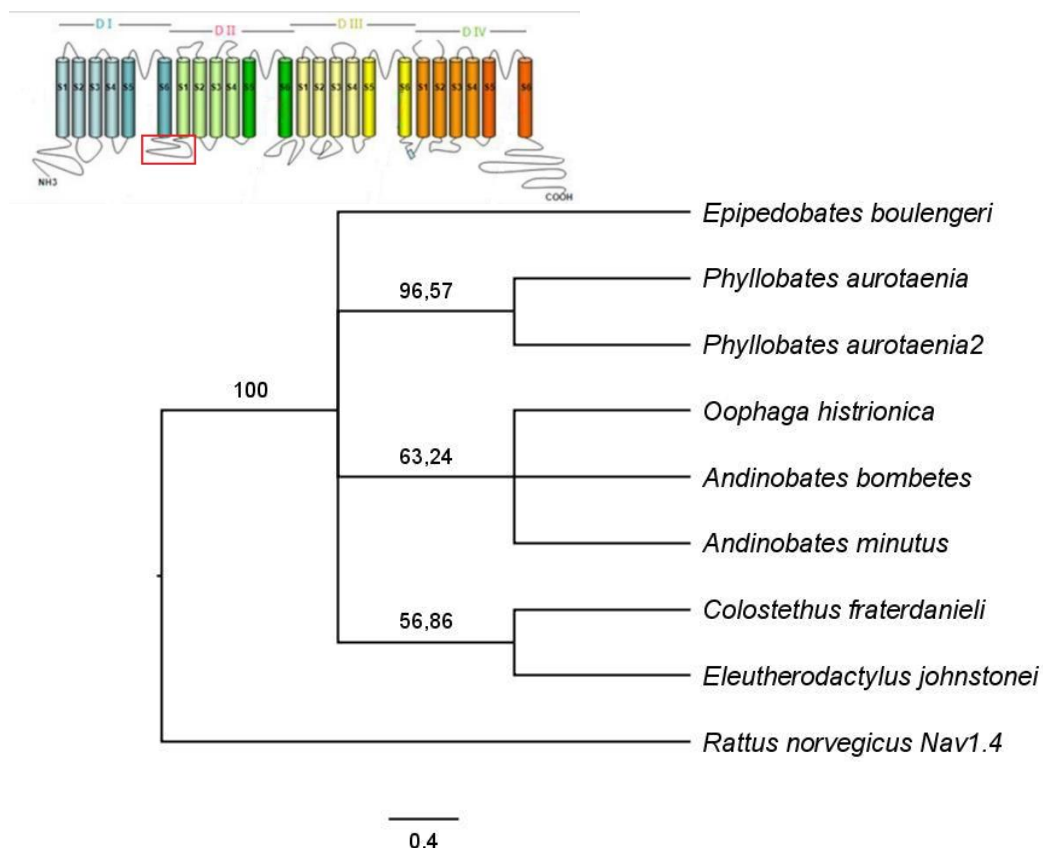


Fig. 64 Árbol filogenético del bucle entre dominio I y II de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 64** se encontró que:

- El bucle entre el dominio I y II contiene 160 residuos, de los cuales sólo 53 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 33,1%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 136 residuos conservados de los 160 del bucle entre el dominio I y II, es decir una similitud del 85%.
- La especie *E. johnstonei* es la que presenta mayor similitud en el bucle entre el dominio I y II terminal, con la especie externa *R. norvegicus*, con una similitud del 39,4%.
- Las especies *E. boulengeri* y *A. bombetes* son las que presentan más diferencias en el bucle entre el dominio I y II, con respecto a la especie externa con una similitud de 37,5%.
- *O. histrionica*, *A. bombetes* y *A. minutus* presentan una alta similitud del 95% en el bucle entre el dominio I y II.
- *C. fraterdanieli* y *E. johnstonei* también presentan una alta similitud del 84,4% en el bucle entre el dominio I y II.

6.2.4.2. Predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio I y II

El bucle entre el dominio I y II es poco conservado entre las especies de estudio y la especie externa *R. norvegicus*, como se pudo observar en el árbol filogenético mostrado anteriormente. Por tanto se realizó una predicción de su estructura secundaria con el servidor CFSSP (Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server(T. Kumar 2013)), como se observa en la **Fig. 65**.

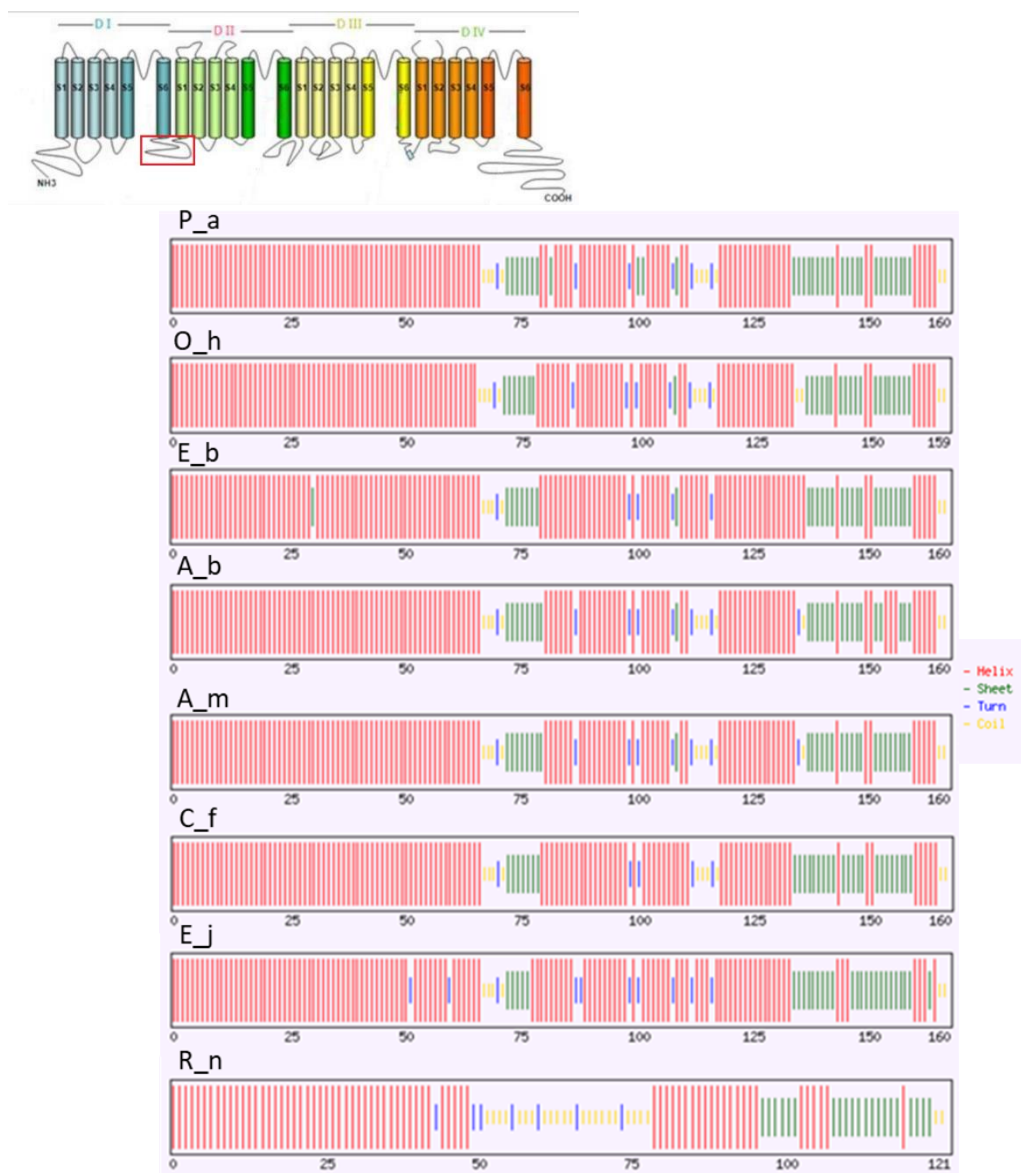


Fig. 65 Predicción de estructura secundaria del bucle entre el dominio I y II de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP. En rojo se observan las hélices alfa, en verde las hojas beta, en azul los giros y en amarillo los espirales. Los números indican la posición de cada uno de los residuos. P_a: *P. aurotaenia*, O_h: *O. histrionica*, E_b: *E. bouleengeri*, A_b: *A. bombetes*, A_m: *A. minutus*, C_f: *C. fraterdanieli*, E_j: *E. johnstonei* y R_n: *R. norvegicus*.

En la predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio I y II (**Fig. 65**) se encontró que las seis especies de dendrobátidos comparten una alta similitud en su estructura secundaria, mientras que la especie control *E. johnstonei* difiere de las especies de dendrobátidos principalmente en la parte central del bucle entre el dominio I y II. De igual manera se puede observar que la estructura secundaria de este bucle en la especie externa *R. norvegicus* difiere bastante (desde aproximadamente el residuo 50, donde hay más proporción de espirales) de la estructura secundaria presente en las especies de estudio incluida la especie control *E. johnstonei*, siendo el bucle de la especie externa un poco más corto comparado con las especies de estudio.

6.2.4.3. Árbol filogenético del bucle entre el dominio II y III

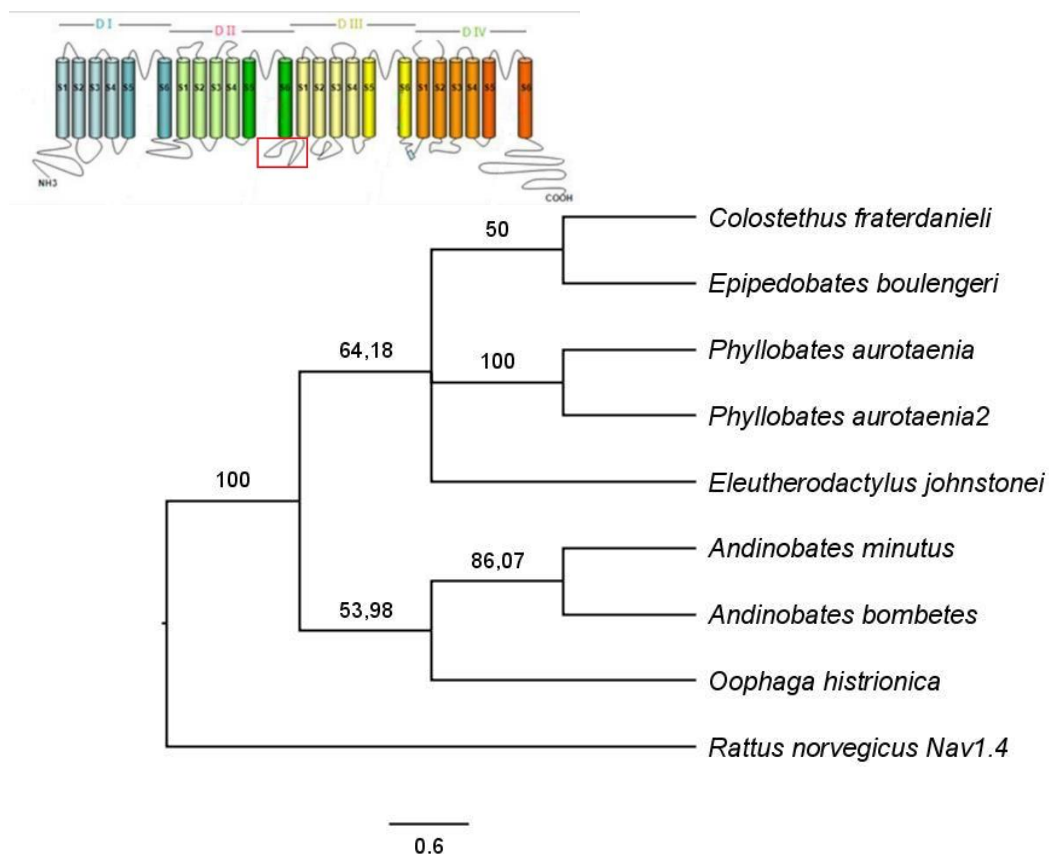


Fig. 66 Árbol filogenético del bucle entre dominio II y III de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (402 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 66** se encontró que:

- El bucle entre el dominio II y III contiene 215 residuos, de los cuales 100 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 44,1%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 185 residuos conservados de los 215 del bucle entre el dominio II y III, es decir una similitud del 86%.
- La especie *O. histrionica* es la que presenta mayor similitud en el bucle entre el dominio II y III, con la especie externa *R. norvegicus*, con una similitud del 49,3%.
- La especie *C. fraterdanieli* es la que presenta más diferencias en el bucle entre el dominio II y III, con respecto a la especie externa, con una similitud de 48%.
- *C. fraterdanieli* y *E. boulengeri* presentan una alta similitud del 96,7% en el bucle entre el dominio II y III.
- *A. minutus* y *A. bombetes* también presentan una alta similitud del 97,7% en el bucle entre el dominio II y III.

6.2.4.4. Predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio II y III

El bucle entre el dominio II y III presenta un porcentaje bajo de similitud de aproximadamente el 44%, entre las especies de estudio y la especie externa *R. norvegicus*, como se pudo observar en el árbol filogenético mostrado anteriormente. Por tanto se realizó una predicción de su estructura secundaria con el servidor CFSSP (Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server(T. Kumar 2013)) como se observa en la **Fig. 67**.

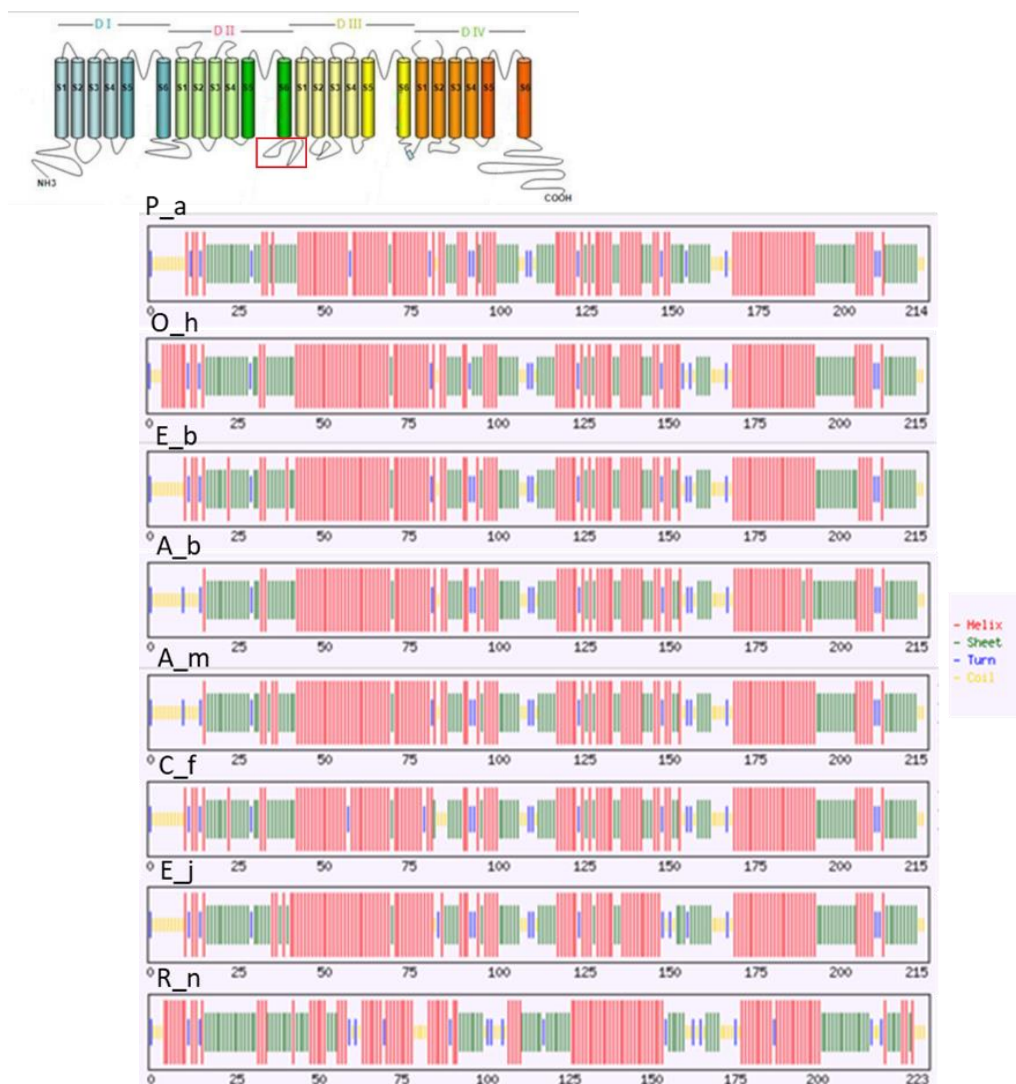


Fig. 67 Predicción de estructura secundaria del bucle entre el dominio II y III de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP. En rojo se observan las hélices alfa, en verde las hojas beta, en azul los giros y en amarillo los espirales. Los números indican la posición de cada uno de los residuos. P_a: *P. aurotaenia*, O_h: *O. histrionica*, E_b: *E. boulengeri*, A_b: *A. bombetes*, A_m: *A. minutus*, C_f: *C. fraterdanieli*, E_j: *E. johnstonei* y R_n: *R. norvegicus*.

De la predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio II y III (**Fig. 67**) **Fig. 65** se encontró que las seis especies de dendrobátidos incluso la especie control *E. johnstonei* comparten una alta similitud en su estructura secundaria, la especie control presenta solo una pequeña diferencia entre aproximadamente el residuo 125 y 150; mientras que si se comparan las especies de estudio con la especie externa *R. norvegicus* se observa que sus estructuras secundarias difieren ampliamente, donde el bucle de la especie externa es un poco más largo si es comparado con las especies de estudio.

6.2.4.5. Árbol filogenético del bucle entre el dominio III y IV

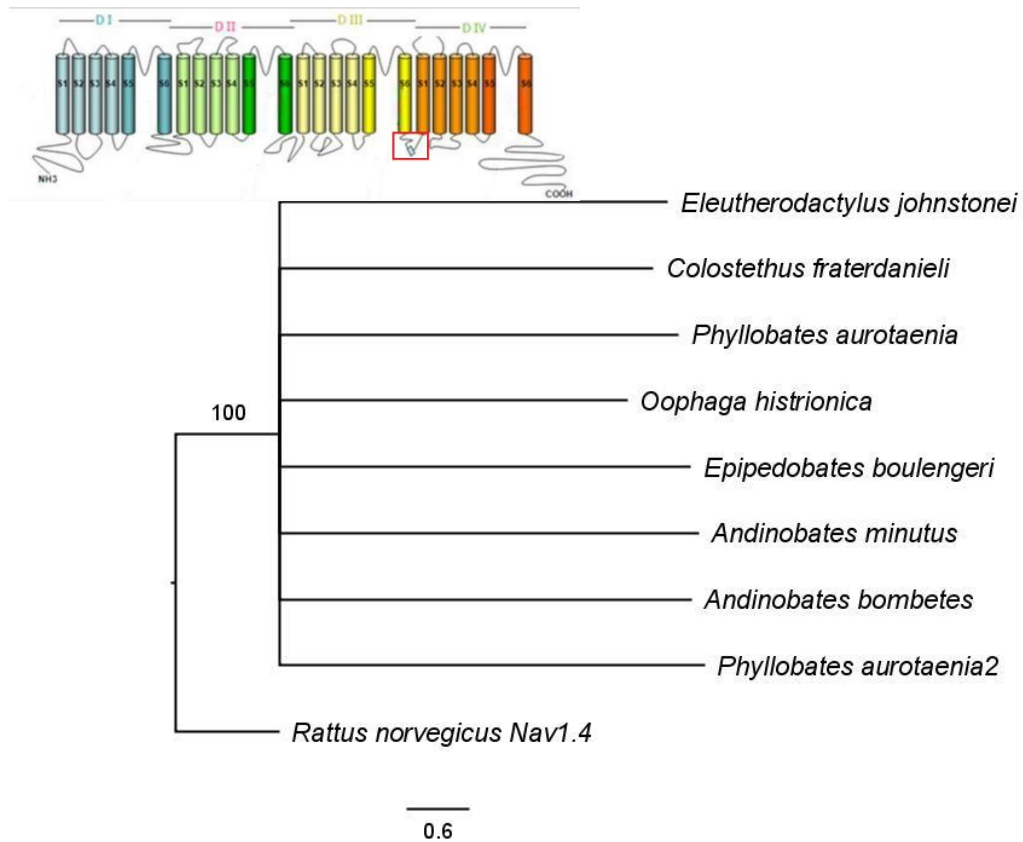


Fig. 68 Árbol filogenético del bucle entre dominio III y IV de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de **Fig. 68** se encontró que:

- El árbol muestra robustez de los datos, por el alto valor de Bootstrap obtenido en cada uno de los nodos.
- El bucle entre el dominio III y IV contiene 53 residuos, de los cuales 47 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 88,7%.
- El bucle entre el dominio III y IV se encuentra completamente conservado en las seis especies de dendrobátidos.

- Las seis especies de dendrobátidos presentan una alta similitud en el bucle entre el dominio III y IV, con la especie externa *R. norvegicus*, con una similitud del 90,6%.
- La especie *E. johnstonei* es la que presenta más diferencias en el bucle entre el dominio III y IV, con respecto a la especie externa, con una similitud de 88,7%.

6.2.4.6. Predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio III y IV

La predicción de la estructura secundaria del bucle entre el dominio III y IV realizada con el servidor CFSSP (Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server(T. Kumar 2013)), se muestra en la **Fig. 69**.

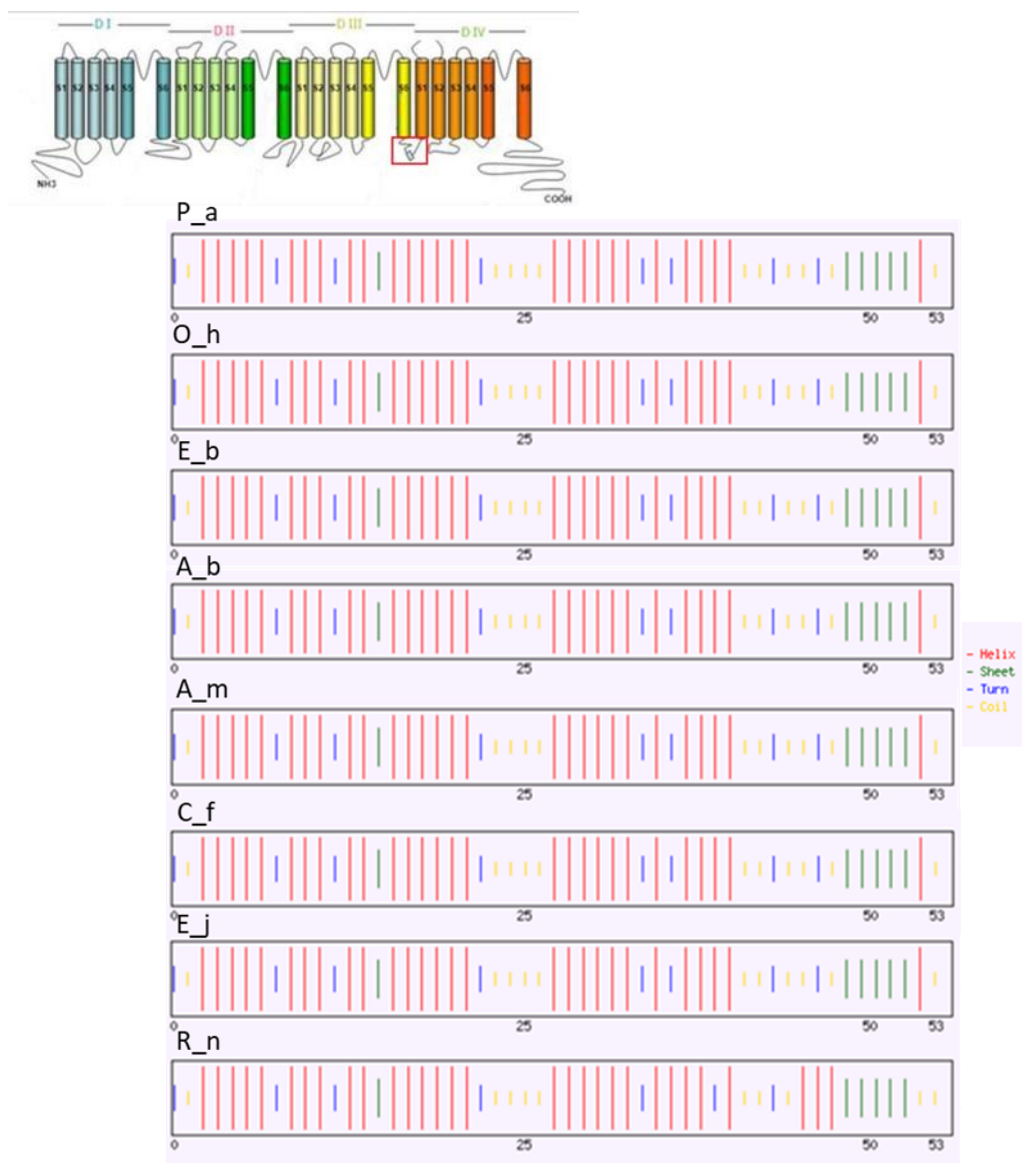


Fig. 69 Predicción de estructura secundaria del bucle entre el dominio III y IV de las especies de estudio realizada con el servidor CFSSP. En rojo se observan las hélices alfa, en verde las hojas beta, en azul los giros y en amarillo los espirales. Los números indican la posición de cada uno de los residuos. P_a: *P. aurotaenia*, O_h: *O. histrionica*, E_b: *E. boulengeri*, A_b: *A. bombetis*, A_m: *A. minutus*, C_f: *C. fraterdanieli*, E_j: *E. johnstonei* y R_n: *R. norvegicus*.

La estructura secundaria (**Fig. 69**) al igual que la primaria se conserva en todas las especies de estudio, incluida la especie control *E. johnstonei*. Sin embargo, al comparar las especies de estudio incluyendo la especie control con la especie externa *R. norvegicus*, la estructura secundaria del bucle entre el dominio III y IV es algo diferente, aproximadamente desde el residuo 37, donde se observa una mayor proporción de hélices alfa. A pesar de esa

pequeña variación, las especies de estudio comparten una alta similitud en la estructura secundaria de esta región comparadas con la especie externa.

6.2.4.7. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el bucle entre el dominio III y IV

En el bucle entre el dominio III y IV se han reportado siete residuos involucrados con la inactivación rápida (residuos en color verde en la **Fig. 70**), a diferencia del ya muy conocido segmento de inactivación rápida IFM (residuos en color azul en la **Fig. 70**). También se han reportado tres residuos involucrados con la inactivación lenta (residuos en color púrpura en la **Fig. 70**).

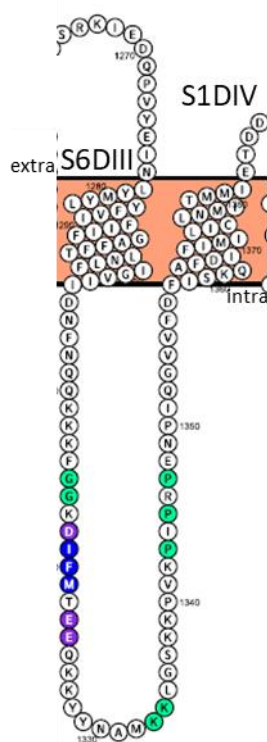


Fig. 70 Estructura primaria del bucle entre el dominio III y IV de *P. aurotaenia*. En color verde se muestran los residuos involucrados en inactivación rápida, en color púrpura los residuos que están involucrados con inactivación lenta y en azul el segmento de inactivación rápida IFM. Los residuos en color verde, púrpura y azul son conservados en las especies de dendrobátidos de estudio y en la rana control *E. johnstonei*.

Experimentos en Nav1.4 de rata han revelado que la carga de los residuos cerca al motivo IFM juegan un papel importante en la cinética de inactivación rápida, por ejemplo, al realizar reducción en la carga positiva de los residuos K1317N y K1318N (correspondientes a los residuos K1333 y K1334 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, mostrados en color verde en la **Fig. 70**), causa una aceleración en la cinética de inactivación rápida en ausencia de la subunidad β (J. Miller et al. 2000). Se observa que estos dos residuos están conservados en todas las especies de estudio.

Mutaciones en los residuos G1484, G1485, P1512, P1514 y P1516 en Nav1.2 de rata (correspondientes a los residuos G1315, G1316, P1343, P1345 y P1347 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, mostrados en color verde en la **Fig. 70**) ralentizan el curso temporal de la inactivación rápida (Kellenberger et al. 1997); sin embargo, se observa que estos cinco residuos permanecen conservados en las especies de dendrobátidos de estudio e incluso en la especie control *E. johnstonei*.

McCollum y colaboradores en 2003, realizaron sustituciones de carga y neutralizaciones de los residuos cargados negativamente D1309Q, E1314 y E1315 (correspondientes a los residuos D1318, E1323 y E1324 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, señaladas en color púrpura en la **Fig. 70**) que rodean el motivo IFM en el bucle entre DIII y DIV del Nav de músculo esquelético de humano y encontraron que estos residuos podrían estar interactuando con estructuras que controlan la inactivación lenta. Nuestras especies de estudio conservan estos tres residuos.

6.2.5. Árboles filogenéticos y residuos involucrados en inactivación rápida y lenta de los segmentos formadores del poro en cada uno de los dominios de los Nav1.4

6.2.5.1. Árbol filogenético del segmento S5, del bucle P y del segmento S6 del dominio I

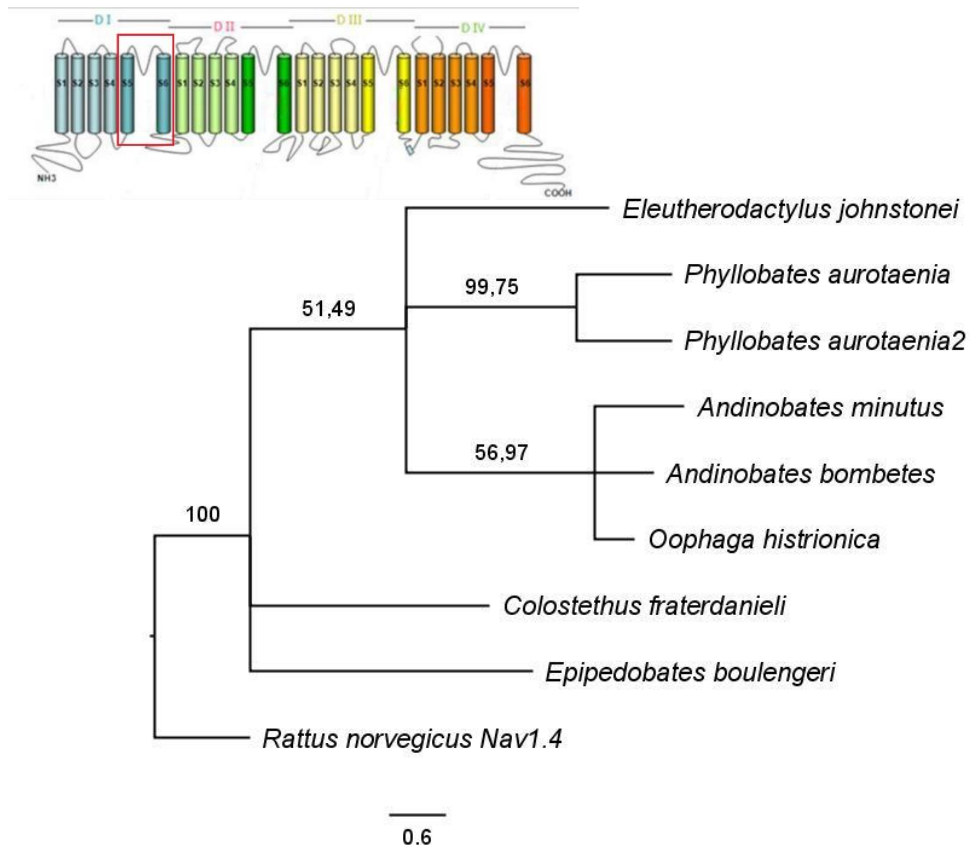


Fig. 71 Árbol filogenético del segmento S5, bucle P y del segmento S6 del dominio I de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (402 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 71** se encontró que:

- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio I contienen 191 residuos, de los cuales 124 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y la especie externa, lo que representa una similitud del 64,9%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 160 residuos conservados de los 191 del segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio I, es decir una similitud del 87,9%.
- La especie *C. fraterdanieli* presentan una alta similitud en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio I, con la especie externa *R. norvegicus*, con un valor de 72,3%.
- La especie *E. johnstonei* es la que presenta más diferencias en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio I, con respecto a la especie externa, con una similitud de 69,1%.
- Las especies *A. minutus*, *A. bombetes* y *O. histrionica* presentan una alta similitud del 96,2% en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio I.

6.2.5.2. Residuos involucrados en inactivación lenta en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio I

Zhang y colaboradores en 2003, reportaron dos residuos involucrados en la inactivación lenta, presentes en el bucle P entre el segmento S5 y S6 del dominio I, señalados en color púrpura en la **Fig. 72**.

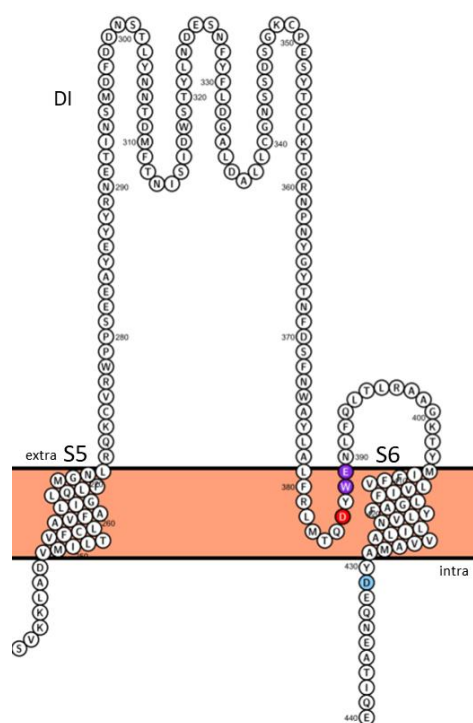


Fig. 72 Estructura primaria del segmento S5, bucle P y S6 del dominio I de *P. aurotaenia*. En color rojo se muestra el residuo D, que conforma el filtro de selectividad DEKA, en color púrpura se señalan los residuos involucrados en inactivación lenta y en color azul celeste residuo relacionado con resistencia a alcaloides en dendrobátidos. Los residuos en color rojo, en color púrpura son conservados en las especies de dendrobátidos de estudio y en la rana control *E. johnstonei*. El residuo en color azul celeste D431 se conserva en todas las especies de estudio, excepto en las especies *C. fraterdanieli* y *E. johnstonei*.

En el estudio de Zhang y colaboradores se menciona que en ausencia de la subunidad $\beta 1$ en el Nav1.4 de rata, la mutante W402C (corresponde al residuo W388 en las especies de estudio de dendrobátidos y en *E. johnstonei*) elimina la inactivación lenta, mientras que la mutación del residuo adyacente E403C o E403R (corresponde al residuo E289 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*), parece favorecer la entrada en el estado de inactivación lenta. Sin embargo, el resultado de este proyecto muestra que estos residuos se encuentran completamente conservados en las especies de estudio.

El reemplazo en el residuo D431 (A445 Nav1.4 de rata) mostrado en color azul celeste en la **Fig. 72** encontrado en todas las especies de dendrobátidos de estudio excepto en *C. fraterdanieli* y en la especie control *E. johnstonei*, ha sido reportado como residuo relacionado con la resistencia a alcaloides como BTX, HTX y PTX en Nav1.4 de dendrobátidos.(Tarvin et al. 2016).

No han sido reportados residuos involucrados con la inactivación rápida en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio I.

6.2.5.3. Árbol filogenético del segmento S5, del bucle P y del segmento S6 del dominio II

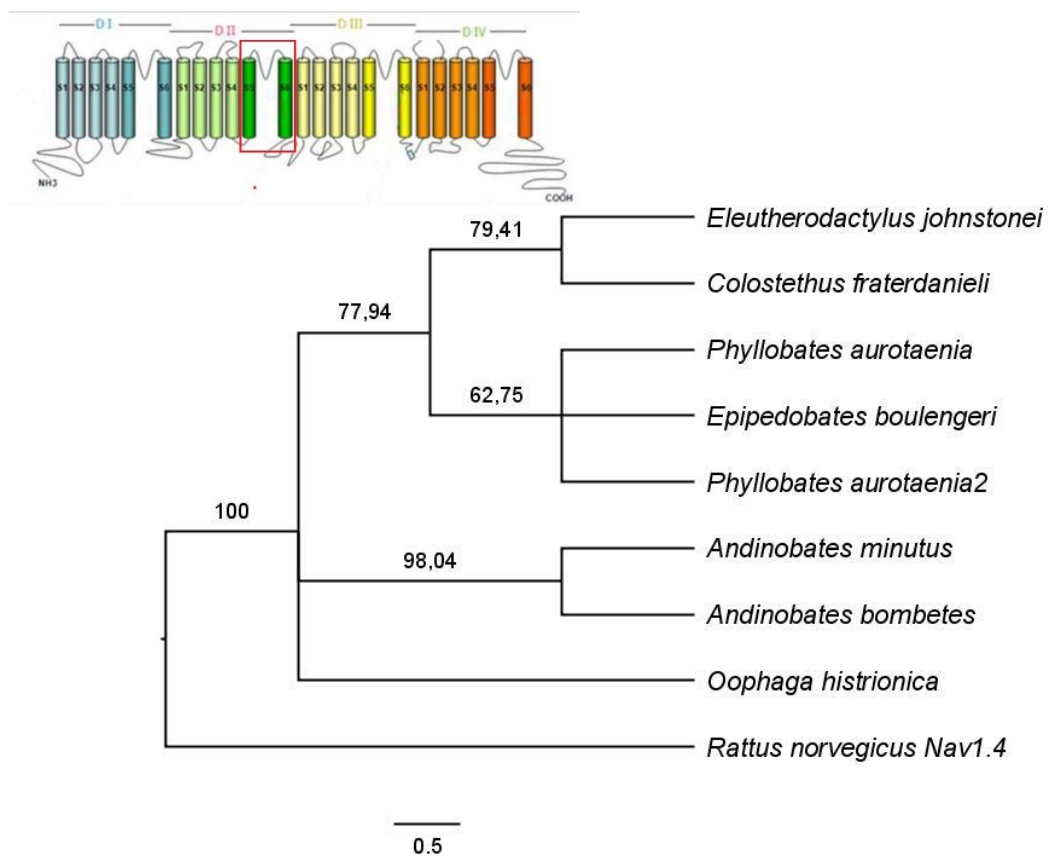


Fig. 73 Árbol filogenético del segmento S5, bucle P y del segmento S6 del dominio II de los Nav1.4. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 73** se encontró que:

- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio II contienen 98 residuos de aminoácidos, de los cuales 89 residuos se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 90,8%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 91 residuos conservados de los 98 del segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio II, es decir una similitud del 92,9%.
- La especie *O. histrionica* presentan una alta similitud en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio II, con la especie externa *R. norvegicus*, con un valor de 95,9%.
- La especie *E. johnstonei* es la que presenta más diferencias en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio II, con respecto a la especie externa, con una similitud de 92,9%.
- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio II, se encuentra completamente conservado entre las especies *A. minutus* y *A. bombetes*; al igual que entre las especies *P. aurotaenia* y *E. boulengeri*.
- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio II, se encuentra altamente conservado entre las especies *C. fraterdanieli* y *E. johnstonei*, con una similitud del 98%.

6.2.5.4. Residuos involucrados en inactivación lenta en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio II

En los segmentos formadores del poro del dominio II, se han reportado tres residuos involucrados con la inactivación lenta, dos de ellos presentes en el bucle P y el otro residuo presente en el S6, señalados en color púrpura en la **Fig. 74**.

DII

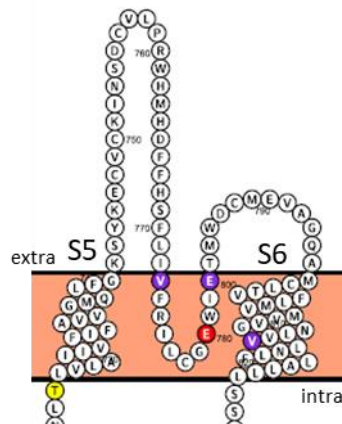


Fig. 74 Estructura primaria del segmento S5, bucle P y S6 del dominio II de *P. aurotaenia*. En color rojo se muestra el residuo E, que conforma el filtro de selectividad DEKA, en color púrpura se señalan los residuos involucrados en inactivación lenta. Los residuos en color rojo y púrpura son conservados en las especies de dendrobátidos de estudio y en la rana control *E. johnstonei*, a excepción del residuo en color púrpura V773.

Uno de los residuos presente en el bucle P, es el E758 en Nav1.4 de rata (correspondiente al residuo E783 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei* **Fig. 74**), el cual hace parte del anillo externo de cargas, junto con E403 en el dominio I, D1241 en el dominio III y D1532 en el dominio IV, residuos que se localizan a tres y cuatro residuos del filtro de selectividad DEKA. Se cree que la inactivación lenta en el canal de sodio está asociada con una reorganización estructural de este anillo externo, según lo reportado por Xiong y colaboradores en el 2003.

En el 2001 Vilin, Fujimoto y Ruben, encontraron que en el segmento de unión entre el segmento S5 y S6 del dominio II, existe un solo residuo que diferencia la inactivación lenta del Nav de músculo esquelético de humano (hNav1.4), de la inactivación lenta del Nav de corazón de humano (hNav1.5), en hNav1.4 el residuo es V754, mientras que en hNav1.5 es el I891. La inactivación lenta en hNav1.4 ocurre con una mayor probabilidad que en hNav1.5. En este estudio realizaron la sustitución de V754 en hNav1.4 por la Isoleucina (I) de hNav1.5 y encontraron que disminuye significativamente la probabilidad de inactivación lenta de un 80% a un 50%. En las especies de estudio este residuo corresponde al 773, de color púrpura en la **Fig. 74**, sin embargo, no todas las especies de estudio presentan el mismo aminoácido, en especies como *P. aurotaenia*, *E. boulengeri*, *C. fraterdanieli* y en *E. johnstonei*, corresponde al residuo V773, mientras que en las especies *O. histrionica*, *A. bombetes* y *A. minutus* corresponde al residuo I773. De acuerdo con lo anterior, se podría inferir que las especies *P. aurotaenia*, *E. boulengeri*, *C. fraterdanieli* y en *E. johnstonei* presentan una mayor probabilidad de presentar inactivación lenta comparada con las especies *O. histrionica*, *A. bombetes* y *A. minutus*.

O'Reilly y colaboradores en el año 2001 evaluaron el efecto del segmento transmembrana S6 del dominio II en la inactivación lenta del Nav1.4 de rata, para cumplir con su objetivo realizaron sustituciones de varios aminoácidos en la posición V787 ubicado en S6DII, (correspondiente al residuo V812 en todas las especies de dendrobátidos de estudio y en la especie control *E. johnstonei* **Fig. 74**); encontraron que la sustitución V787K entra en el estado de inactivación lenta 100 veces más rápido que la variante natural, mientras que la sustitución V787C muestra una resistencia al estado de inactivación lenta, efecto opuesto al observado por la sustitución V787K. En todas las especies de estudio de dendrobátidos e incluso en la especie control *E. johnstonei* este residuo permanece conservado.

No han sido reportados residuos involucrados con inactivación rápida en los segmentos formadores del poro del dominio II.

6.2.5.5. Árbol filogenético del segmento S5, del bucle P y del segmento S6 del dominio III

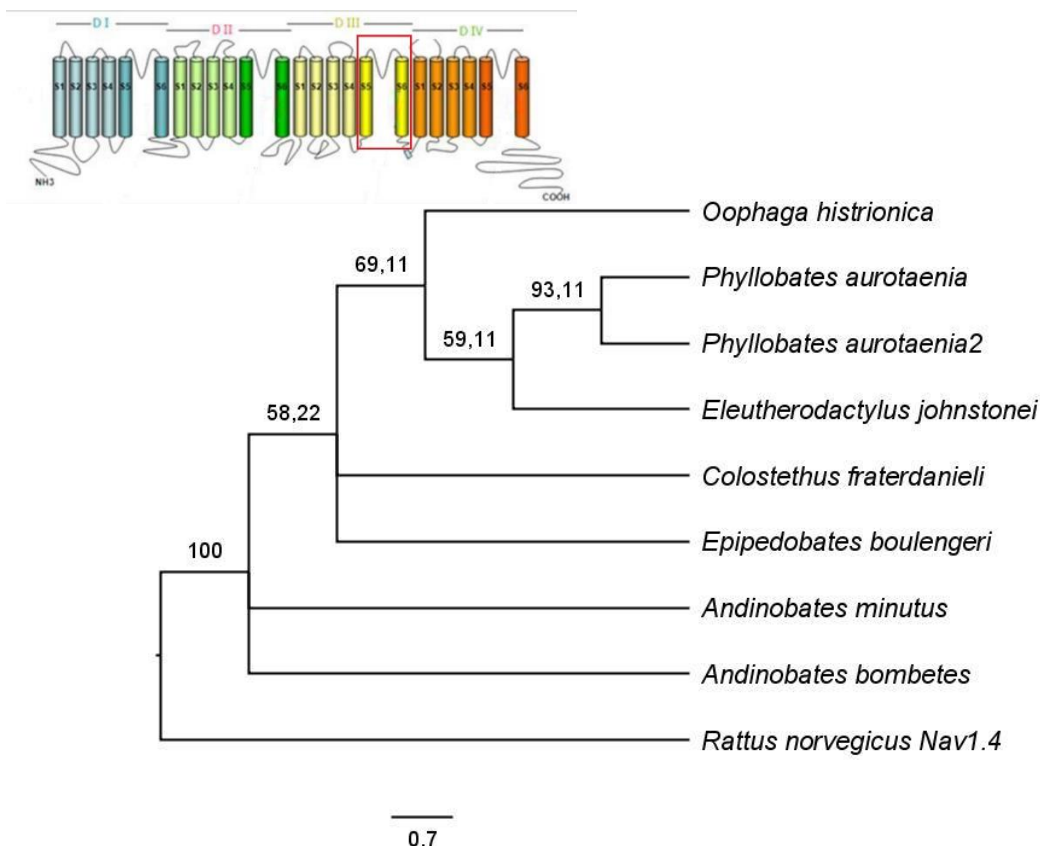


Fig. 75 Árbol filogenético del segmento S5, bucle P y del segmento S6 del dominio III de los **Nav1.4**. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (450 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 75** se encontró que:

- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio III contienen 133 residuos, de los cuales 108 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 81,2%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 125 residuos conservados de los 133 del segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio III, es decir una similitud del 94%.

- Las especies *A. bombetes* y *A. minutus* presentan una alta similitud en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio III, con la especie externa *R. norvegicus*, con un valor de 85%.
- La especie *O. histrionica* es la que presenta más diferencias en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio III, con respecto a la especie externa, con una similitud de 82%.
- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio III, se encuentra altamente conservado entre las especies *A. minutus* y *A. bombetes*, con una similitud del 98,5%.
- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio III, también se encuentra altamente conservado entre las especies *C. fraterdanieli* y *E. boulengeri*, con una similitud del 99,2%.

6.2.5.6. Residuos involucrados en inactivación lenta en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio III

En los segmentos formadores del poro del dominio III, se han reportado dos residuos involucrados con la inactivación lenta, presentes en el segmento de unión entre el segmento S5 y S6, señalados en color púrpura en la **Fig. 76**.

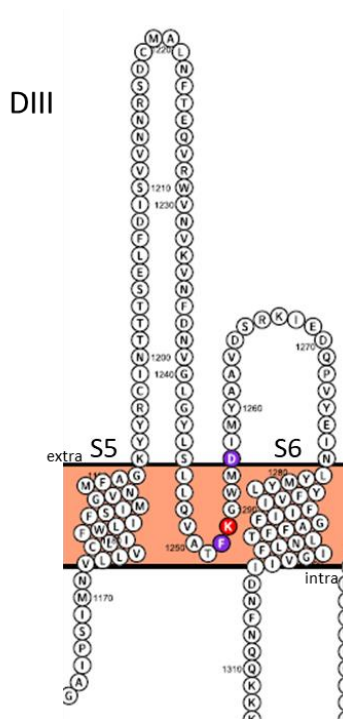


Fig. 76 Estructura primaria del segmento S5, bucle P y S6 del dominio III de *P. aurotaenia*. En color rojo se muestra el residuo K, que conforma el filtro de selectividad DEKA y en color púrpura se señalan los residuos involucrados en inactivación lenta. Los residuos en color rojo y púrpura son conservados en las especies de dendrobátidos de estudio y en la rana control *E. johnstonei*.

En el año 2000 Ong y colaboradores, quisieron evaluar si mutaciones en el bucle P del dominio III modificaban la cinética de inactivación lenta, por lo cual realizaron mutación del residuo F1236C en Nav1.4 de rata (correspondiente al residuo F1252 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, **Fig. 76**), encontraron que los canales mutados exhiben componentes cinéticos intermedios (30 ms) y ultra lentos (2 s) de inactivación lenta; además este residuo se ha reportado como importante en la acción de AL. El modelo sugiere que la reorganización estructural del bucle P asociada con la inactivación lenta puede estabilizar la unión del AL lidocaína. En nuestras especies de estudio se observa que este residuo se encuentra conservado.

El residuo K1237 en Nav1.4 de rata (correspondiente al residuo K1253 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*), mostrado en color rojo en la **Fig. 76**, hace parte del filtro de selectividad DEKA, produce cambios sustanciales en el proceso de inactivación, para evaluar esto Todt y colaboradores en el año 1999, realizaron mutaciones al residuo K1237S y K1237E y encontraron que los canales entraban a un estado de inactivación del cual se recuperaban muy lentamente; las constantes de tiempo de entrada y salida de este estado fueron de aproximadamente 100s. Sin embargo, se observa que este residuo permanece conservado en todas las especies de dendrobátidos de estudio e incluso en la especie control *E. johnstonei*.

Uno de los residuos presente en el bucle P del dominio III, es el D1241 en Nav1.4 de rata (correspondiente al residuo D1257 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, de color púrpura en la **Fig. 76**), hace parte como se había mencionado anteriormente del anillo externo de cargas, junto con E403 en el dominio I, E758 en el dominio II y D1532 en el dominio IV, se cree que la inactivación lenta en el canal de sodio está asociada con una reorganización estructural de este anillo externo, según lo reportado por Xiong y colaboradores en el 2003.

En los segmentos S5, bucle P y S6 del dominio III no se han reportado residuos relacionados con la inactivación rápida.

6.2.5.7. Árbol filogenético del segmento S5, del bucle P y del segmento S6 del dominio IV

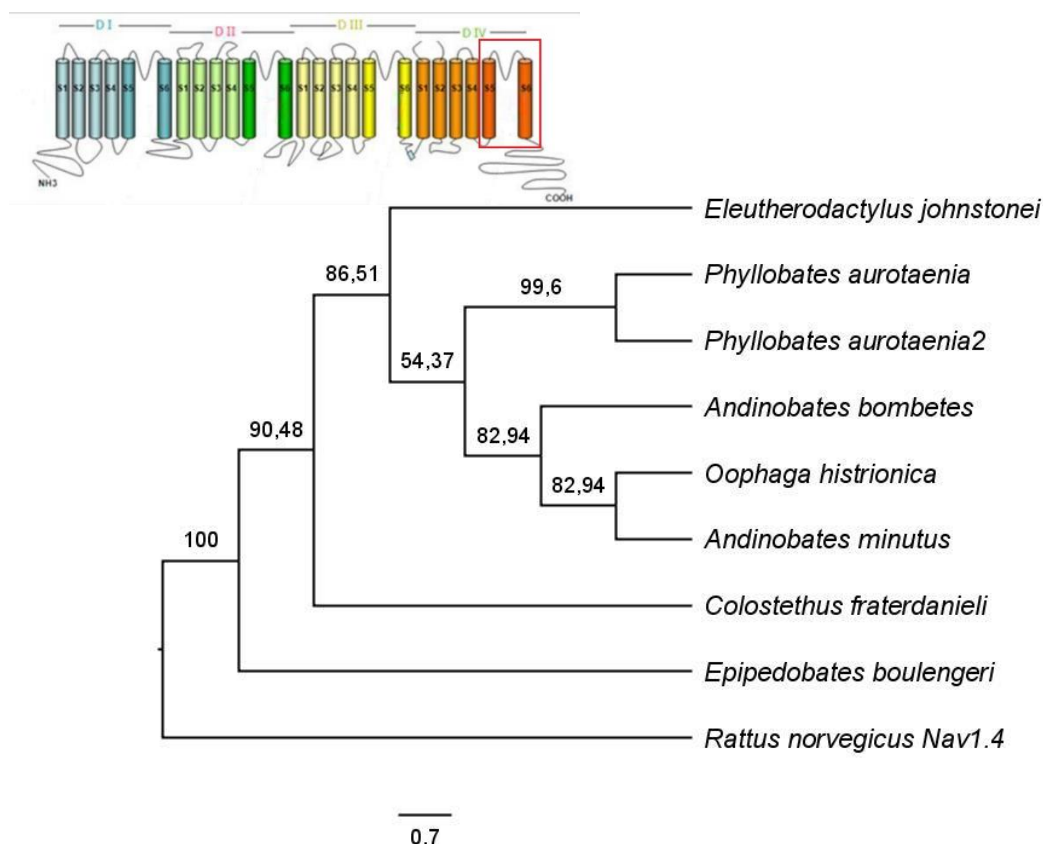


Fig. 77 Árbol filogenético del segmento S5, bucle P y del segmento S6 del dominio IV de los **Nav1.4**. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (252 repeticiones).

Del alineamiento y del árbol filogenético de la **Fig. 77** se encontró que:

- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio IV contienen 114 residuos, de los cuales 98 se encuentran conservados en las seis especies de estudio, en la especie control y en la especie externa, lo que representa una similitud del 86%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 105 residuos conservados de los 114 del segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio IV, es decir una similitud del 92,1%.

- Las especies *E. boulengeri*, *C. fraterdanieli*, *A. minutus* y *O. histrionica* presentan una alta similitud en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio IV, con la especie externa *R. norvegicus*, con un valor de 93,9%.
- Las especies *E. johnstonei*, *P. aurotaenia* y *A. bombetes* son las que presentan más diferencias en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio IV, con respecto a la especie externa, con una similitud de 92,1%.
- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio IV, se encuentra completamente conservado entre las especies *O. histrionica* y *A. minutus*.
- El segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio IV, se encuentra altamente conservado entre las especies *C. fraterdanieli* y *E. boulengeri*, con una similitud del 97,4%.

6.2.5.8. Residuos involucrados en inactivación rápida y lenta en el segmento S5, el bucle P y el segmento S6 del dominio IV

En los segmentos formadores del poro del dominio IV se han reportado cuatro residuos involucrados con la inactivación rápida, ubicados en el segmento S6 (residuos de color verde en la **Fig. 78**), un residuo relacionado con la inactivación lenta presente en el bucle P (residuo de color púrpura en la **Fig. 78**), un residuo relacionado con una patología que puede afectar la inactivación lenta (residuo de color amarillo en la **Fig. 78**) y por último se ha reportado un residuo implicado con el sitio de unión de BTX en el segmento S6 que puede estar relacionado con la maquinaria de activación del canal (residuo de color naranja en la **Fig. 78**).



Como se había mencionado anteriormente el residuo D1532 en Nav1.4 de rata (correspondiente al residuo D1548 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, residuo de color púrpura en la **Fig. 78**) es uno de los residuos que forma el anillo externo de cargas, junto con los otros residuos ubicados en el bucle P de los otros tres dominios (E403, E758 y D1241) es importante para la inactivación lenta, según lo reportado por Xiong y colaboradores en el 2003).

131

completamente conservados, incluso en la especie *P. aurotaenia*, ya que los residuos I1575 y F1579 también forman parte del sitio receptor de BTX y AL.

McPhee y colaboradores en 1995 también evaluaron el efecto de los residuos en DIVS6 en la inactivación rápida y encontraron que la doble mutación de los residuos F1764A y V1774A en Nav de cerebro de rata (Nav1.2) (correspondientes a los residuos F1495 y I1605 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, residuos de color verde en la **Fig. 78**), inhibía casi completamente la inactivación rápida, sin interactuar directamente con IFM. Cabe aclarar que el residuo F1764 en Nav1.2 de rata corresponde al F1579 en Nav1.4 de rata y el residuo V1774 en Nav1.2 de rata corresponde al residuo I1589 en Nav1.4 de rata. Se observa que los Nav de músculo esquelético de las especies de estudio incluida la especie control *E. johnstonei* conservan el residuo Isoleucina (I) en la posición 1605 de su homólogo en rata. No hay datos de cuál sería la respuesta si se repitiera este experimento en Nav1.4 de rata, aunque estos dos residuos Isoleucina (I) y Valina (V) comparten las mismas características de aminoácidos hidrofóbicos.

Hayward y colaboradores en el año 1997, determinaron que la mutación M1585V en Nav1.4 de rata (correspondiente al residuo M1601 en las especies de dendrobátidos y en *E. johnstonei*, residuo de color amarillo en la **Fig. 78**) causa el trastorno HyperPP al igual que el residuo T698 en el segmento de unión entre el segmento S4 y S5 en DII (discutido anteriormente) y que esta mutación tiene dañada la inactivación lenta. Sin embargo, observamos que los Nav de las especies de estudio tienen conservado este residuo.

Como se había mencionado anteriormente mutaciones en el segmento IVS6 afectan la inactivación rápida, la inactivación lenta, la acción de BTX y la acción de AL, para detectar cambios conformacionales asociados con estos procesos, Vedantham y colaboradores en el año 2000 realizaron sustitución del residuo V1583C en Nav1.4 de rata (correspondiente al residuo I1599 en *P. aurotaenia* y a V1599 en el resto de las especies de estudio incluida la especie control *E. johnstonei*, mostrado en color naranja en la **Fig. 78**) y encontraron que se presenta un cambio conformacional que parece ser influenciado por parte del mecanismo de inactivación rápida IFM, de igual manera los resultados demostraron que hay un movimiento correlacionado con la inactivación lenta en las vecindades de V1583C, pero no arroja demasiado información sobre la base estructural de la inactivación lenta; por tanto, estos resultados llevan a la hipótesis que la inactivación lenta es un cambio conformacional que involucra a más de un área del canal, incluido el poro externo y el vestíbulo interno. Este residuo V1583 está implicado en el sitio de unión de BTX y solo en el Nav de músculo esquelético de *P. aurotaenia* presenta un cambio por una Isoleucina (I), sin embargo, esta sustitución no fue evaluada por el grupo de Vedantham, lo que no significa que deja de ser importante.

6.2.6. Conclusiones Capitulo II

- Todos los arboles filogenéticos muestran robustez de los datos, por el alto valor de Bootstrap superior al 50%, obtenido en cada uno de los nodos.
- El árbol filogenético de la secuencia completa de los Nav 1.4 de las especies de estudio, muestra que las especies pertenecientes a la familia Dendrobatidae se encuentran agrupadas en dos clados, uno el de la subfamilia Dendrobatinae (con las especies *A. minutus*, *A. bombetes*, *O. histrionica* y *P. aurotaenia*) y el otro clado formado por la subfamilia Colostethinae (con las especies *E. boulengeri* y *C. fraterdanieli*).
- La especie *C. fraterdanieli* es la que comparte mayor similitud en la secuencia completa de Nav1.4 con respecto a la especie externa *R. norvegicus*, con un valor del 74%, mientras que la especie *E. johnstonei* es la que presenta la similitud más baja en la secuencia completa de Nav1.4 con respecto a la especie externa *R. norvegicus*, con un valor del 73,2%
- Los cuatro dominios se encuentran altamente conservados entre las seis especies de dendrobátidos, siendo el dominio IV el más conservado, con una similitud del 94,4%, mientras que el dominio I es el menos conservado, con una similitud del 89,4%.
- Tanto el extremo carboxilo terminal, como el amino terminal se encuentran altamente conservados entre las seis especies de dendrobátidos; el extremo amino terminal presenta una similitud del 85,1% y el extremo carboxilo terminal presenta una similitud del 90,6%.
- El extremo C-terminal que ha sido vinculado con la inactivación rápida del Nav, en la especie *P. aurotaenia* mostró una diferencia en su estructura secundaria, comparada con las otras especies de dendrobátidos evaluadas en este proyecto, específicamente en los últimos 12 residuos donde hay mayor proporción de espirales y ausencia de hojas beta.
- De los bucles presentes entre cada uno de los cuatro dominios de los Nav1.4 de las especies de estudio, se encontró que el bucle entre el dominio II y III es el más largo

con una longitud de 227 residuos, mientras que el bucle entre el dominio III y IV es el más corto con una longitud de solo 53 residuos.

- El bucle entre el dominio III y IV se encuentra completamente conservado entre los Nav1.4 de las seis especies de dendrobátidos.
- De los segmentos formadores del poro de los Nav1.4 de las especies de estudio se encontró que el del dominio I es el más largo, con una longitud de 191 residuos, mientras que el del dominio II es el más corto con una longitud de 98 residuos.
- Los segmentos formadores del poro se encuentran altamente conservados en las secuencias de los Nav1.4 de las seis especies de dendrobátidos, siendo el segmento formador del poro del dominio III el más conservado, con una similitud del 94%.
- Ninguna de las 21 mutaciones implicadas en la modulación de la inactivación rápida (reportadas por otros autores y para otras especies) en los Nav1.4 se presenta en las especies de dendrobátidos evaluadas en este proyecto, ni siquiera en *P. aurotaenia* que es el canal sobre el que se tiene evidencia funcional.
- De los 21 residuos implicados en la modulación de la inactivación rápida (reportados por otros autores y para otras especies), solo el residuo L1163 ubicado en el segmento de unión de S4 con S5 del dominio III, presenta sustitución por Valina (V) en la especie control *E. johnstonei*. Sin embargo, esta sustitución no ha sido evaluada anteriormente y para probar su importancia se hace necesario realizar experimentos funcionales.
- El residuo I1605 ubicado en DIVS6 en todas las especies de estudio incluida la especie control *E. johnstonei* no ha sido evaluado anteriormente en el Nav1.4 de rata, solo se evaluó la mutación por Alanina (A) en el Nav1.2 de rata, donde este residuo cambia por una Valina (V) (de las mismas características hidrofóbicas).
- De los 13 residuos implicados en la modulación de la inactivación lenta (reportados por otros autores y para otras especies), solo el residuo V754 ubicado en el segmento de unión entre S5 y S6 del dominio II de hNav1.4 (corresponde al I891 en hNav1.5) cambia en las especies de estudio (corresponde al residuo 773), donde las especies *P. aurotaenia*, *E. boulengeri*, *C. fraterdanieli* y en *E. johnstonei* conservan el residuo Valina (V) presente en hNav1.4, mientras que las especies *O. histrionica*, *A. bombetes* y *A. minutus* presentan el residuo Isoleucina (I), característico de hNav1.5.

- El residuo D431 presente en el bucle entre el dominio I y II, reportado por Tarvin y colaboradores en 2016 relacionado con la resistencia a alcaloides como BTX, HTX y PTX, está presente en todas las especies de dendrobátidos de estudio excepto en *C. fraterdanieli* y en la especie control *E. johnstonei* donde este residuo cambia por una Alanina (A) al igual que en Nav1.4 de rata.
- La mutación en el residuo V1583C ubicado en DIVS6 de Nav1.4 de rata no se presenta en ninguno de los Nav1.4 de las especies de estudio; sin embargo, en la especie *P. aurotaenia* este residuo presenta una sustitución por una Isoleucina (I1599) que no ha sido evaluada anteriormente en la modulación de la inactivación rápida.
- El residuo V1583 también ha sido involucrado con el sitio de unión de BTX se conserva en todas las especies de estudio a diferencia de la especie *P. aurotaenia*, cuyo residuo es reemplazado por una Isoleucina (I).

6.3. CAPITULO III: Comparación de los residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX de Nav de rata con las secuencias obtenidas de Nav1.4 de las especies de estudio

Para cumplir con el tercer objetivo, en este capítulo se expone la estructura primaria del Nav (diseñada por medio de la herramienta Web Protter) con los residuos implicados en el sitio receptor de AL y en el sitio receptor de BTX y AL, ubicados en cada uno de los segmentos transmembrana S6 de los cuatro dominios; que han sido reportados por otros autores para Nav1.4 de rata, igualmente se exponen los resultados de las comparaciones realizadas a partir de árboles filogenéticos, de estos residuos con los residuos presentes en las secuencias obtenidas de los Nav1.4 de las especies de estudio, incluida la secuencia de la rana control *E. johnstonei*.

6.3.1. Residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX y árbol filogenético del DIS6

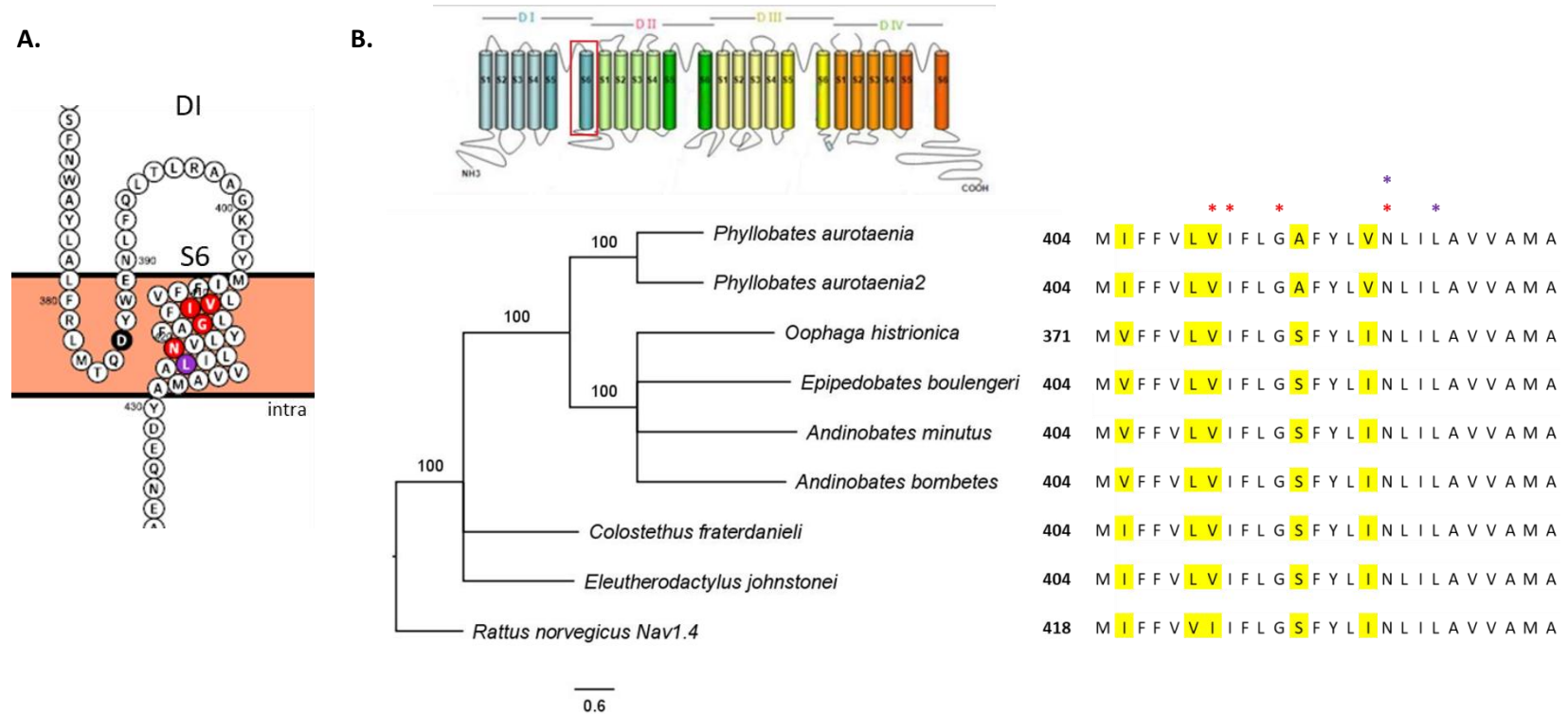


Fig. 79 Estructura primaria y árbol filogenético de DIS6. **A.** Estructura primaria de *P. aurotaenia*, en color negro se muestra el residuo D, que forma parte del filtro de selectividad DEKA. **B.** Árbol filogenético de DIS6. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones). Subrayados en amarillo se muestran los residuos variables. En las dos graficas en color rojo se señalan los residuos implicados en el sitio receptor de AL y en color púrpura los residuos implicados en el sitio receptor tanto de BTX como de AL.

Del alineamiento y del árbol filogenético del dominio IS6 (**Fig. 79**) se encontró lo siguiente:

- El segmento transmembrana S6 del dominio I, está compuesto por 26 residuos, de los cuales 21 se encuentran conservados entre las seis especies de estudio, la especie control y la especie externa, lo que representa una similitud del 80.8%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 23 residuos conservados de los 26 en el segmento transmembrana S6 del dominio I, es decir que presentan una similitud del 88.5%.
- Las especies *E. johnstonei* y *C. fraterdanieli* son las que presentan mayor similitud en el segmento transmembrana S6 del dominio I, con la especie externa *R. norvegicus*, con un valor del 92.3%; con solo dos reemplazos de aminoácidos, correspondientes a los residuos L409 (V423 en *R. norvegicus*) y V410 (I424 en *R. norvegicus*) en dendrobátidos y en la especie control.
- La especie *P. aurotaenia* es la que presenta más diferencias en el dominio IS6, con respecto a la especie externa, con cinco reemplazos de aminoácidos, correspondientes a los residuos L409 (V423 *R. norvegicus*), V410 (I424 *R. norvegicus*), A415 (S429 *R. norvegicus*), V419 (I433 *R. norvegicus*) y D431 (A445 *R. norvegicus*) en dendrobátidos, lo que representa una similitud del 84.6%.
- Los reemplazos en los residuos A415 (S429 *R. norvegicus*) y V419 (I433 *R. norvegicus*) reportados en este estudio sólo para el canal Nav de *P. aurotaenia* han sido reportados como reemplazos relacionados con la resistencia a toxinas como BTX, HTX y PTX en Nav1.4 de Dendrobátidos (Tarvin et al. 2016). Sin embargo, en el estudio de Tarvin y colaboradores esos reemplazos solo están presentes en la especie *P. terribilis* más no en *P. aurotaenia*. Es decir que se encuentran diferencias en el Nav entre *P. aurotaenia* del estudio de Tarvin y *P. aurotaenia* del presente estudio.
- El dominio IS6 se encuentra completamente conservado entre las especies *C. fraterdanieli* y *E. johnstonei* al igual que entre las especies *A. bombetes*, *A. minutus*, *E. boulengeri* y *O. histrionica*.

- Las mutaciones en el Nav1.2 de rata de los residuos I409 y N418 por Alanina (A) (residuos en color rojo en la **Fig. 79**) en el segmento IS6 reportadas por el grupo de Yarov-Yarovoy en el 2002, disminuían el bloqueo dependiente del uso por etidocaína. En los Nav1.4 de las especies de estudio incluso en *E. johnstonei* estos dos residuos están conservados.
- Kondratiev and Tomaselli en el 2003 realizaron mutaciones en los residuos I424C y I425C (I409 Nav1.2 de rata) y G428C de Nav1.4 de rata (residuos en color rojo en la **Fig. 79**) y encontraron que los dos primeros residuos son determinantes en la unión de lidocaína, estas mutaciones reducen el bloqueo dependiente del uso de este AL, mientras que G428C reduce la sensibilidad a lidocaína solo en estado de reposo sin presentar alteraciones en la cinética de activación. En la **Fig. 79** se observa que solo uno de estos residuos el I424 en Nav1.4 presenta una sustitución por Valina (V) en todas las especies de estudio incluida la especie control. Cabe aclarar que la sustitución realizada por el grupo de Kondratiev fue por un aminoácido polar sin carga positiva, mientras que la mutación natural encontrada en las especies de estudio fue por un aminoácido hidrofóbico, de las mismas características del residuo Isoleucina (I) encontrado en Nav1.4 de rata.
- Las mutaciones en los residuos N434K (N418 en Nav1.2) y L437K del Nav1.4 de rata que brindan resistencia a BTX (S.-Y. Wang and Wang 1998), también reducen la potencia por el AL etidocaína según lo reportado por G. Wang, Quan, and Wang 1998. Esta reducción en la potencia de etidocaína ocurre tanto en estado de reposo como en estado inactivado. Sin embargo, se observa que estos dos residuos, mostrados en color púrpura **Fig. 79** en la permanecen conservados en todas las especies de estudio incluso en *E. johnstonei*.
- Los otros reemplazos de aminoácidos mostrados en el dominio IS6 no han sido reportados como importantes en el sitio receptor de AL ni de BTX.

6.3.2. Residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX y árbol filogenético del DIIS6

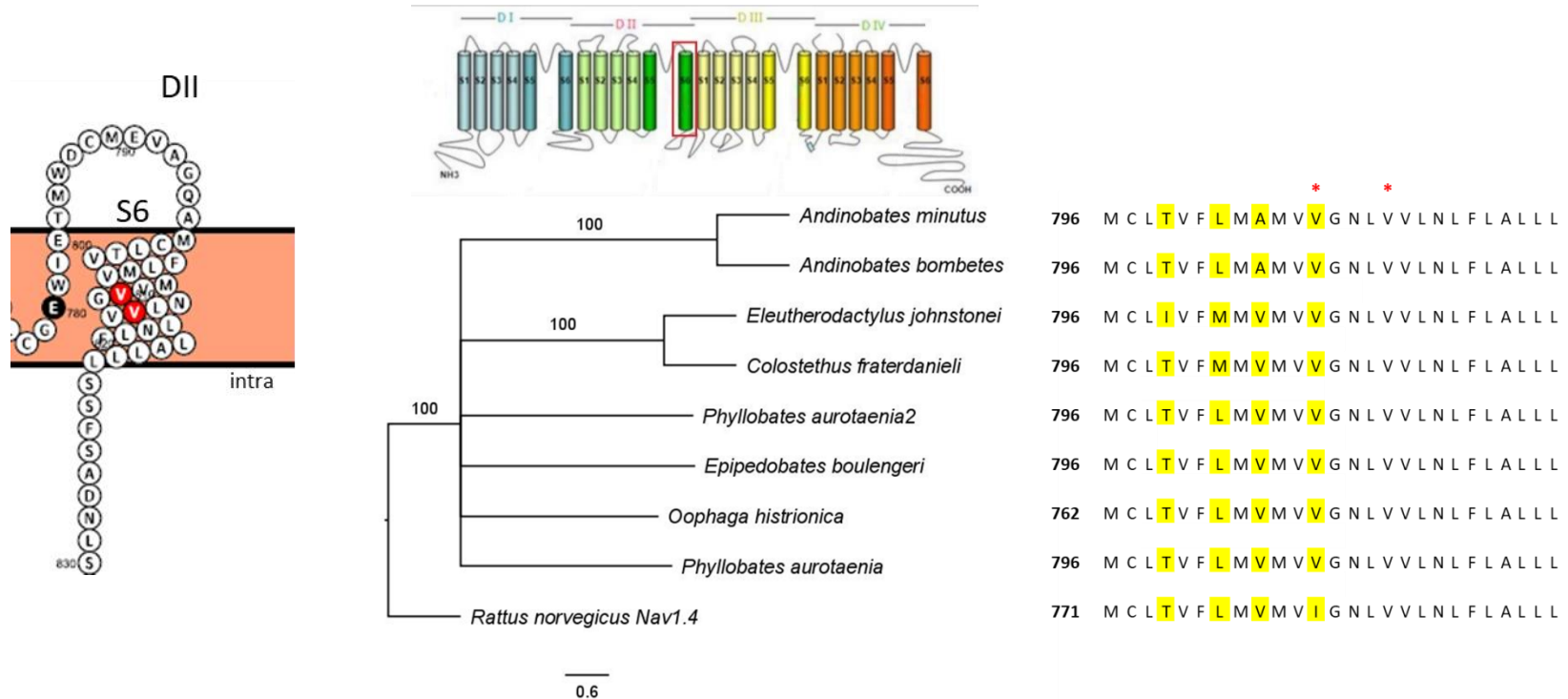


Fig. 80 Estructura primaria y árbol filogenético de DIIS6. A. Estructura primaria de *P. aurotaenia*, en color negro se muestra el residuo E, que forma parte del filtro de selectividad DEKA. **B.** Árbol filogenético de DIIS6. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones). Subrayados en amarillo se muestran los residuos variables. En las dos graficas en color rojo se señalan los residuos implicados en el sitio receptor de AL.

Del alineamiento y del árbol filogenético del dominio IIS6 (**Fig. 80**) se encontró lo siguiente:

- El segmento transmembrana S6 del dominio II, está compuesto por 26 residuos, de los cuales 22 se encuentran conservados entre las seis especies de estudio, la especie control y la especie externa, lo que representa una similitud del 84,6%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 24 residuos conservados de los 26 en el segmento transmembrana S6 del dominio II, es decir que presentan una similitud del 92,3%.
- Las especies *P. aurotaenia*, *O. histrionica* y *E. boulengeri* son las que presentan mayor similitud en el segmento transmembrana S6 del dominio II, con la especie externa *R. norvegicus*, con un valor del 96,2%, con solo un reemplazo en un residuo, correspondiente al residuo V807 (I782 en *R. norvegicus*) en dendrobátidos.
- La especie *E. johnstonei* es la que presenta más diferencias en el dominio IIS6, con respecto a la especie externa; con tres reemplazos de aminoácidos, correspondientes a los residuos I799 (T774 *R. norvegicus*), M802 (L777 *R. norvegicus*) y V807 (I782 *R. norvegicus*) en la especie control, lo que representa una similitud del 88,5%.
- El dominio IIS6 se encuentra completamente conservado entre las especies *P. aurotaenia*, *O. histrionica* y *E. boulengeri* al igual que entre las especies *A. bombetex* y *A. minutus*.
- Kondratiev and Tomaselli en el 2003 también realizaron mutaciones en los residuos I782C y V786C de Nav1.4 de rata (residuos en color rojo en la **Fig. 80**) y encontraron que estos dos aminoácidos son determinantes en la unión de lidocaína, estas mutaciones reducen el bloqueo dependiente del uso de este AL e incluso plantearon una relación topológica de estos dos residuos con los otros residuos en S6 de los otros dominios determinantes en la acción de AL. En la **Fig. 80** se observa que solo uno de estos residuos el I782 en Nav1.4 de rata presenta una sustitución por Valina (V) en todas las especies de estudio incluida la especie control. Cabe aclarar que la sustitución realizada por el grupo de Kondratiev fue por un aminoácido polar sin carga positiva, mientras que la mutación natural encontrada en las especies de estudio fue por un aminoácido hidrofóbico, de las mismas características del residuo Isoleucina (I) encontrado en Nav1.4 de rata.

- En el dominio IIS6 no se han reportado residuos importantes en el sitio receptor de BTX y AL.
- Los otros reemplazos de aminoácidos mostradas en el dominio IIS6 no han sido reportadas como importantes en el sitio receptor de AL ni de BTX.

6.3.3. Residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX y árbol filogenético del DIIS6

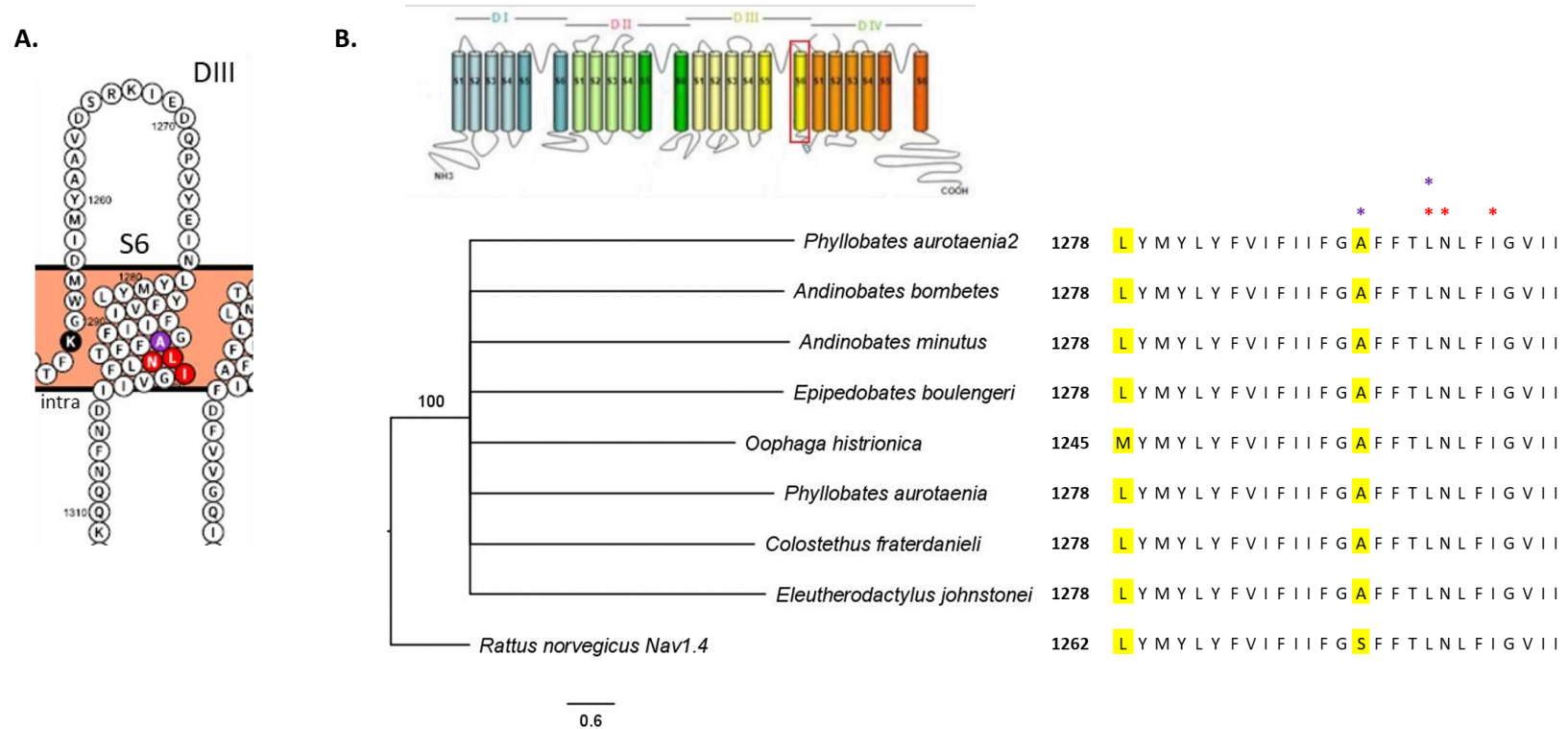


Fig. 81 Estructura primaria y árbol filogenético de DIIS6. **A.** Estructura primaria de *P. aurotaenia*, en color negro se muestra el residuo K, que forma parte del filtro de selectividad DEKA. **B.** Árbol filogenético de DIIS6. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones). Subrayados en amarillo se muestran los residuos variables. En las dos graficas en color rojo se señalan los residuos implicados en el sitio receptor de AL y en color púrpura los residuos implicados en el sitio receptor tanto de BTX como de AL.

Del alineamiento y del árbol filogenético del dominio IIS6 (**Fig. 81**) se encontró lo siguiente:

- El segmento transmembrana S6 del dominio III, está compuesto por 27 residuos, de los cuales 25 se encuentran conservados entre las seis especies de estudio, la especie control y la especie externa, lo que representa una similitud del 92,6%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 26 residuos conservados de los 27 en el segmento transmembrana S6 del dominio III, es decir que presentan una similitud del 96,3%.
- La especie control *E. johnstonei* y todas las especies de dendrobátidos a excepción de *O. histrionica* presentan una alta similitud en el segmento transmembrana S6 del dominio III, con la especie externa *R. norvegicus*, con un valor del 96,3%, con solo un reemplazo de aminoácido, correspondiente al residuo A1292 (S1276 en *R. norvegicus*) en dendrobátidos y la especie control.
- La especie *O. histrionica* presenta dos reemplazos de aminoácidos en el dominio IIS6, con respecto a la especie externa; correspondientes a los residuos M1245 (L1262 *R. norvegicus*), y A1292 (S1276 *R. norvegicus*), lo que representa una similitud del 92,6%. El residuo M1245 no ha sido reportado como importante en el sitio receptor de AL ni de BTX.
- Las mutaciones reportadas por el grupo de Yarov-Yarovoy en el 2001 en los residuos L1465A y I1469A de Nav1.2 (residuos en color rojo en la **Fig. 81**) que reducen el bloqueo por lamotrigina y etidocaína en el estado inactivado y en el residuo N1466A (residuo de color rojo en la **Fig. 81**) que presenta un efecto fuerte en el bloqueo por etidocaína, no se presentan de manera natural en las especies de estudio, estos tres residuos se encuentran completamente conservados, tanto en las especies de dendrobátidos como en la especie control *E. johnstonei*.

- La sustitución por Lisina (K) en el Nav1.4 de rata en los residuos S1276 (residuo en color púrpura en la **Fig. 81**) y L1280 (L1465 en Nav1.2 de rata), realizada por Wang y colaboradores en el año 2000, mostró resistencia a 5mM de BTX durante pulsos repetitivos y reducción de la afinidad por bupivacaina entre 10 y 20 veces en estado inactivado. Se observa en la **Fig. 81** que sólo el residuo S1276 de Nav1.4 de rata presenta una sustitución por Alanina (A) en todas las especies de estudio incluida *E. johnstonei*. Cabe aclarar que la sustitución realizada por el grupo de Wang fue por un aminoácido con carga positiva, mientras que la mutación natural encontrada en las especies de estudio fue por un aminoácido hidrofóbico.

6.3.4. Residuos implicados en el sitio receptor de AL y BTX y árbol filogenético del DIVS6

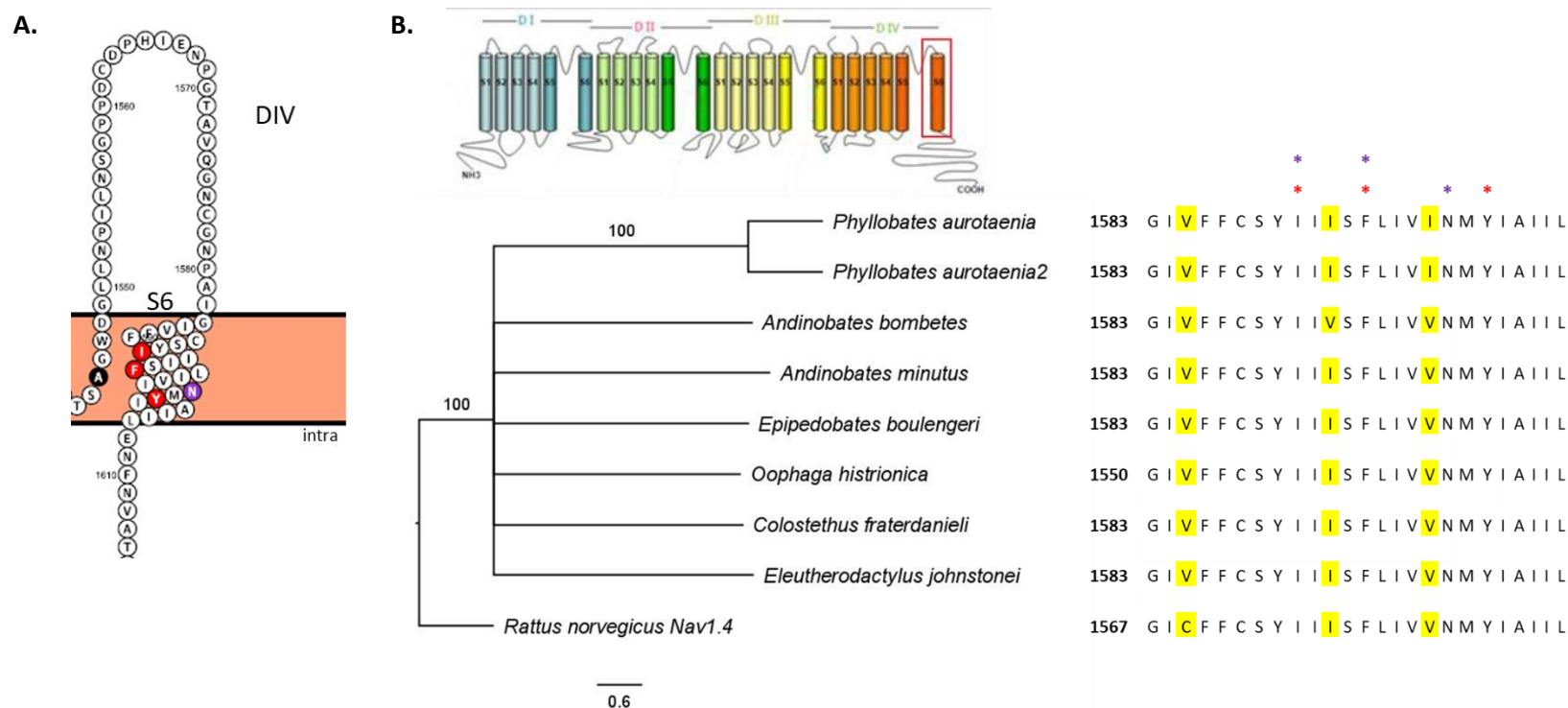


Fig. 82 Estructura primaria y árbol filogenético de DIVS6. **A.** Estructura primaria de DIVS6 de *P. aurotaenia*, en color negro se muestra el residuo A, que forma parte del filtro de selectividad DEKA. **B.** Árbol filogenético de DIVS6. Los números son los valores de bootstrap en porcentaje (204 repeticiones). Subrayados en amarillo se muestran los residuos variables. En las dos graficas en color rojo se señalan los residuos implicados en el sitio receptor de AL y en color púrpura los residuos implicados en el sitio receptor tanto de BTX como de AL.

Del alineamiento y del árbol filogenético del dominio IVS6 (**Fig. 82**) se encontró lo siguiente:

- El segmento transmembrana S6 del dominio IV, está compuesto por 25 residuos, de los cuales 22 se encuentran conservados entre las seis especies de estudio, la especie control y la especie externa, lo que representa una similitud del 88%.
- Las seis especies de dendrobátidos presentan 23 residuos conservados de los 25 en el segmento transmembrana S6 del dominio IV, es decir que presentan una similitud del 92%.
- La especie control *E. johnstonei* y las especies de dendrobátidos *C. fraterdanieli*, *O. histrionica*, *E. boulengeri* y *A. minutus* presentan una alta similitud en el segmento transmembrana S6 del dominio IV, con la especie externa *R. norvegicus*, con un valor del 96%, con solo un reemplazo de aminoácido, correspondiente al residuo V1586 (C1569 en *R. norvegicus*).
- Las especies *A. bombetes* y *P. aurotaenia* presentan cada una dos reemplazos de aminoácidos en el dominio IVS6, con respecto a la especie externa; en *A. bombetes* corresponde a los residuos V1585 (C1569 *R. norvegicus*) y V1593 (I1577 *R. norvegicus*), mientras que en *P. aurotaenia* los dos reemplazos corresponden a los residuos V1585 (C1569 *R. norvegicus*) y al residuo I1599 (V1583 *R. norvegicus*).
- El reemplazo en el residuo I1599 (V1583 *R. norvegicus*) solamente encontrado en *P. aurotaenia* ha sido reportado como un reemplazo relacionado con la resistencia a alcaloides como BTX, HTX y PTX en Nav1.4 de dendrobátidos (Tarvin et al. 2016)
- El dominio IVS6 se encuentra completamente conservado entre las especies *E. johnstonei*, *C. fraterdanieli*, *O. histrionica*, *E. boulengeri* y *A. minutus*.

- Los residuos reportados por el grupo de Ragsdale en 1994 importantes en el sitio receptor de AL, I1760, F1764 y Y1771 en Nav1.2 rata (corresponden a los residuos I1575, F1579 y Y1586 en Nav1.4 de rata), mostrados en color rojo en la **Fig. 82**, se encuentran completamente conservados en todas las especies de estudio. Linford y colaboradores en 1998 reportaron que dos de estos residuos I1760 y F1764 eran esenciales también para la unión de BTX, sin embargo, no se observan cambios ni siquiera en la especie *P. aurotaenia*.
- La sustitución con Lisina(K) de los residuos F1579 (residuo en color rojo en la **Fig. 82**) y N1584 en Nav1.4 de rata (residuo en color púrpura en la **Fig. 82**) demostró que los Nav presentaban resistencia a BTX, sin embargo se puede observar que los dos residuos están conservados en todas las especies de estudio.
- Los tres reemplazos de aminoácidos encontradas en el dominio IVS6, subrayados en amarillo en la **Fig. 82** no han sido reportadas como importantes ni en el sitio receptor de AL ni de BTX.

6.3.5. Conclusiones Capitulo III

- Todos los árboles filogenéticos muestran robustez de los datos, el valor obtenido de bootstrap fue 100% en cada uno de los nodos.
- Los segmentos transmembrana S6 de los cuatro dominios se encuentran altamente conservados entre las especies de dendrobátidos, la especie control *E. johnstonei* y la especie externa *R. norvegicus*, siendo el del dominio III el más conservado con una similitud del 92,6% y el del dominio I el menos conservado, con una similitud del 78,6%.
- Los segmentos transmembrana S6 de los cuatro dominios de la especie *C. fraterdanieli* presentan solo 6 reemplazos de aminoácidos, mientras que las especies *E. boulengeri* y la especie control *E. johnstonei* presentan 7 reemplazos de aminoácidos, lo que representa una similitud superior al 93%, con respecto a la especie externa *R. norvegicus*.
- Las especies *A. bombetes* y *P. aurotaenia* son los que presentan más reemplazos de aminoácidos en los segmentos transmembrana S6, con un total de 9 reemplazos en los cuatro segmentos, lo que representa una similitud del 91,5% con respecto a la especie externa *R. norvegicus*.
- De los 9 reemplazos presentes en los segmentos S6 de los cuatro dominios de *P. aurotaenia* y de *A. bombetes* solo tres se han reportado como residuos implicados en el sitio receptor tanto de AL como de BTX, los cuales son; en el dominio IS6 el reemplazo I424V, en el dominio IIS6 el reemplazo I782V y en el dominio IIIS6 el reemplazo S1276A.
- De los 12 residuos implicados en el sitio receptor de AL (reportados por otros autores y para otras especies), se encontraron sólo dos reemplazos de aminoácidos, el residuo V410 ubicado en el dominio IS6 (I424 Nav1.4 de rata) y el residuo V807 ubicado en el dominio IIS6 (I782 Nav1.4 de rata), tanto en las seis especies de dendrobátidos como en la especie control *E. johnstonei*. Sin embargo, estas sustituciones no han sido evaluadas hasta el momento y para probar su importancia se hace necesario realizar experimentos funcionales.

- De los 7 residuos implicados en el sitio receptor de BTX y AL (reportados por otros autores y para otras especies), solo uno de ellos presenta reemplazo y es el residuo A1292 ubicado en IIS6 (S1276 Nav1.4 de rata), tanto en las seis especies de dendrobátidos como en la especie control *E. johnstonei*. Sin embargo, estas sustituciones no han sido evaluadas hasta el momento y para probar su importancia se hace necesario realizar experimentos funcionales
- La resistencia a alcaloides se ha reportado que es más alta en especies que presentan múltiples reemplazos de aminoácidos en Nav1.4 y en este proyecto se observa que sucede con la especie *P. aurotaenia* donde se encontraron cuatro reemplazos relacionados con la resistencia a alcaloides y aledaños a los residuos vinculados con el sitio de unión de BTX y AL (S429A, I433V, A445D en IS6 y V1583I en IVS6). Mientras que en *O. histrionica*, *E. boulengeri*, *A. bombetes* y *A. minutus* se encontró solo un reemplazo (A445D).

7. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados de este proyecto se propone realizar estudios de la función de la subunidad alfa del canal Nav1.4 de las especies de estudio, por medio de técnicas de electrofisiología para probar el efecto tanto de los alcaloides como de los anestésicos locales y determinar si los reemplazos encontrados son suficientes para determinar resistencia o insensibilidad a dichas sustancias.

De igual manera se propone caracterizar las subunidades beta del canal Nav1.4 de las especies de estudio y estudiar a nivel funcional si se modifica el efecto tanto de los alcaloides como de los anestésicos locales cuando la subunidad alfa esta en presencia de la subunidad beta.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, A.R. 2017. "Lista de Los Anfibios En Colombia: Referencia En Línea V.07.2017.0." <http://www.batrachia.com>.

Adam, KR., H. Schmidt, R. Stampfli, and C. Weiss. 1966. "The Effect Of Scorpion Venom On Single Myelinated Nerve Fibres Of The Frog." *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 26 (3): 666–77.

Albuquerque, EX., JE. Warnick, FM. Sansone, and J. Daly. 1973. "The Pharmacology of Batrachotoxin. V. A Comparative Study of Membrane Properties and the Effect of Batrachotoxin on Sartorius Muscles of the Frogs *Phyllotes Aurotaenia* and *Rana Pipiens*." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 184 (2): 315–29.

Albuquerque, EX, JW Daly, and B Witkop. 1971. "Batrachotoxin: Chemistry and Pharmacology." *Science* 172 (3987): 995–1002.

Albuquerque, EX, I Seyama, and T Narahashi. 1973. "Characterization of Batrachotoxin-Induced Depolarization of the Squid Giant Axons." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 184 (2): 308–14.

Albuquerque, EX., N. Brookes, R. Onur, and JE. Warnick. 1976. "Kinetics of Interaction of Batrachotoxin and Tetrodotoxin on Rat Diaphragm Muscle." *Molecular Pharmacology* 12 (1): 82–91.

Anderson, PA, MA Holman, and RM Greenberg. 1993. "Deduced Amino Acid Sequence of a Putative Sodium Channel from the Scyphozoan Jellyfish *Cyanea Capillata*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (15). National Academy of Sciences: 7419–23.

- Anger, T., DJ. Madge, M. Mulla, and D. Riddall. 2001. "Medicinal Chemistry of Neuronal Voltage-Gated Sodium Channel Blockers." *Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2): 115–37.
- Babin, DR, DD Watt, SM Goos, and RV Mlejnek. 1975. "Amino Acid Sequence of Neurotoxin I from *Centruroides Sculpturatus* Ewing." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 166 (1): 125–34.
- Bagal, SK., AD. Brown, PJ. Cox, K. Omoto, RM. Owen, DC. Pryde, B. Sidders, et al. 2012. "Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective." *Journal of Medicinal Chemistry* 56: 593–624.
- Bagal, SK., BE. Marron, RB. Owen, RL. Storer, and NA. Swain. 2015. "Voltage Gated Sodium Channels as Drug Discovery Targets." *Channels (Austin, Tex.)* 9 (6): 360–66.
- Bai, CX., IW. Glaaser, T. Sawanobori, and A. Sunami. 2003. "Involvement of Local Anesthetic Binding Sites on IVS6 of Sodium Channels in Fast and Slow Inactivation." *Neuroscience Letters* 337 (1): 41–45.
- Barchi, RL. 1983. "Protein Components of the Purified Sodium Channel from Rat Skeletal Muscle Sarcolemma." *Journal of Neurochemistry* 40 (5): 1377–85.
- Bartels de Bernal, E., MI. Llano, and E. Díaz. 1975. "Algunos Efectos de La Batracotoxina Sobre Las Electroplacas de La Anguila Eléctrica Y Su Antagonismo Con Anestésicos Locales." *Colombia Médica* 6 (3): 74–80.
- Becker, DE., and KL. Reed. 2006. "Essentials of Local Anesthetic Pharmacology." *Anesthesia Progress* 53 (3): 98-108-110.
- . 2012. "Local Anesthetics: Review of Pharmacological Considerations." *Anesthesia Progress* 59 (2): 90–102.
- Beneski, DA., and WA. Catterall. 1980. "Covalent Labeling of Protein Components of the Sodium Channel with a Photoactivable Derivative of Scorpion Toxin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (1): 639–43.

Benoit, E., AM. Legrand, and JM. Dubois. 1986. "Effects of Ciguatoxin on Current and Voltage Clamped Frog Myelinated Nerve Fibre." *Toxicon* 24 (4): 357–64.

Béress, L., and R. Béress. 1975. "Purification of Three Polypeptides with Neuro-and Cardiotoxic Activity from the Sea Anemone *Anemonia Sulcata*." *Toxicon* 13 (5): 359–67.

Béress, L., R. Béress, and G. Wunderer. 1975. "Isolation and Characterization of Three Polypeptides with Neurotoxic Activity from *Anemonia Sulcata*." *FEBS Letters* 50 (3): 311–14.

Bergman, C., JM. Dubois, E. Rojas, and W. Rathmayer. 1976. "Decreased Rate of Sodium Conductance Inactivation in the Node of Ranvier Induced by a Polypeptide Toxin from Sea Anemone." *Biochimica et Biophysica Acta* 455 (1): 174–84.

Bernal, MH., and JD. Lynch. 2008. "Review and Analysis of Altitudinal Distribution of the Andean Anurans in Colombia." *Zootaxa* 1826.

Blumenthal, KM., and AL. Seibert. 2003. "Voltage-Gated Sodium Channel Toxins: Poisons, Probes, and Future Promise." *Cell Biochemistry and Biophysics* 38 (2): 215–38.

Brau, ME., C. Nau, G. Hempelmann, and W. Vogel. 1995. "Local Anesthetics Potently Block a Potential Insensitive Potassium Channel in Myelinated Nerve." *The Journal of General Physiology* 105 (4): 485–505.

Brau, ME., W. Vogel, and G. Hempelmann. 1998. "Fundamental Properties of Local Anesthetics." *Anesthesia & Analgesia* 87 (4): 885–89.

Bruhova, I., DB. Tikhonov, and BS. Zhorov. 2008. "Access and Binding of Local Anesthetics in the Closed Sodium Channel." *Molecular Pharmacology* 74 (4): 1033–45.

Burrowes, PA, and CW Myers. 1987. "A New Poison Frog (*Dendrobates*) from Andean Colombia: With Notes on a Lowland Relative." *American Museum of Natural History* 2899: 1–17.

Cahalan, MD. 1975. "Modification of Sodium Channel Gating in Frog Myelinated Nerve Fibres by Centruroides Sculpturatus Scorpion Venom." *The Journal of Physiology* 244 (2): 511–34.

Castaño, S. 2011. "Estudio Estructural Y Funcional Del Canal de Sodio Dependiente de Voltaje de Músculo Esquelético de La Rana Phyllobates Aurotaenia." Universidad del Valle.

Castaño, S., L. Frezza, A. Labro, L. Fierro, F. Bezanilla, and AM. Correa. 2009. "Cloning and Sequence Analysis of the Voltage-Gated Muscle Na⁺ Channel from the Poison Dart Frog Phyllobates Aurotaenia." *Biophysical Journal* 96 (3). Elsevier: 247a.

Catterall, WA. 1992. "Cellular and Molecular Biology of Voltage-Gated Sodium Channels." *Physiological Reviews* 72 (4 Suppl): S15-48.

———. 2000. "From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels." *Neuron* 26 (1): 13–25.

Catterall, WA. 1975a. "Activation of the Action Potential Na⁺ Ionophore of Cultured Neuroblastoma Cells by Veratridine and Batrachotoxin." *Journal of Biological Chemistry* 250 (11): 4053–59.

———. 1975b. "Cooperative Activation of Action Potential Na⁺ Ionophore by Neurotoxins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1782–86.

———. 1979. "Binding of Scorpion Toxin to Receptor Sites Associated with Sodium Channels in Frog Muscle. Correlation of Voltage-Dependent Binding with Activation." *Journal of General Physiology* 74 (3): 375–91.

———. 1980. "Neurotoxins That Act on Voltage-Sensitive Sodium Channels in Excitable Membranes." *Annual Review of Pharmacological and Toxicology* 20: 15–43.

———. 1981. "Inhibition of Voltage-Sensitive Sodium Channels in Neuroblastoma Cells by Antiarrhythmic Drugs." *Mol Pharmacol* 20 (2): 356–62.

———. 1986a. "Voltage-Dependent Gating of Sodium Channels: Correlating Structure and Function." *Trends in Neurosciences* 9 (January): 7–10.

———. 1986b. "Molecular Properties of Voltage-Sensitive Sodium Channels." *Annual Review of Biochemistry* 55 (1): 953–85.

———. 1987. "Common Modes of Drug Action on Na⁺ Channels: Local Anesthetics, Antiarrhythmics and Anticonvulsants." *Trends in Pharmacological Sciences* 8 (2): 57–65.

———. 2014. "Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels at Atomic Resolution." *Experimental Physiology* 99 (1): 35–51.

Catterall, WA., S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, FH. Yu, K. Konoki, and T. Scheuer. 2007. "Voltage-Gated Ion Channels and Gating Modifier Toxins." *Toxicon* 49 (2): 124–41.

Catterall, WA., and M. Gainer. 1985. "Interaction of Brevetoxin A with a New Receptor Site on the Sodium Channel." *Toxicon* 23 (3): 497–504.

Catterall, WA., R. Ray, and CS. Morrow. 1976. "Membrane Potential Dependent Binding of Scorpion Toxin to Action Potential Na⁺ Ionophore." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (8): 2682–86.

Cestele, S., Y. Qu, JC. Rogers, H. Rochat, T. Scheuer, and WA. Catterall. 1998. "Voltage Sensor-trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by Beta-Scorpion Toxin Bound to the S3–S4 Loop in Domain II." *Neuron* 21 (4): 919–31.

Chen, R., A. Robinson, and S. Chung. 2014. "Mechanism of M-Conotoxin PIIIA Binding to the Voltage-Gated Na⁺ Channel Nav1.4." *Plos One* 9 (3): 1–8.

Chen, Z., B-H. Ong, NG. Kambouris, E. Marbán, GF. Tomaselli, and JR. Balser. 2000. "Lidocaine Induces a Slow Inactivated State in Rat Skeletal Muscle Sodium Channels." *The Journal of Physiology* 524 (1): 37–49.

Clare, JJ., SN. Tate, M. Nobbs, and MA. Romanos. 2000. "Voltage-Gated Sodium Channels as Therapeutic Targets." *Drug Discovery Today* 5 (11): 506–20.

Correa, AM., R. Latorre, and F. Bezanilla. 1991. "Ion Permeation in Normal and Batrachotoxin-Modified Na⁺ Channels in the Squid Giant Axon." *The Journal of General Physiology* 97 (3). The Rockefeller University Press: 605–25.

Corzo, G., N. Gilles, H. Satake, E. Villegas, L. Dai, T. Nakajima, and J. Haupt. 2003. "Distinct Primary Structures of the Major Peptide Toxins from the Venom of the Spider *Macrothele gigas* That Bind to Sites 3 and 4 in the Sodium Channel." *FEBS Letters* 547 (1–3): 43–50.

Couraud, F., E. Jover, JM. Dubois, and H. Rochat. 1982. "Two Types of Scorpion Toxin Receptor Sites, One Related to the Activation, the Other to the Inactivation of the Action Potential Sodium Channel." *Toxicon* 20 (1): 9–16.

Courtney, KR. 1975. "Mechanism of Frequency-Dependent Inhibition of Sodium Currents in Frog Myelinated Nerve by the Lidocaine Derivative GEA." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 195 (2): 225–36.

Crone, HD., B. Leake, MW. Jarvis, and SE. Freeman. 1976. "On the Nature of 'Maculotoxin', a Toxin from the Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena maculosa*)." *Toxicon* 14 (6): 423–26.

Cuendet, M., and JM. Pezzuto. 2007. "Antitumor Alkanoids in Clinical Use or in Clinical Trials." In *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, 25–52. Weinheim, Germany.

Cummins, TR., and FJ. Sigworth. 1996. "Impaired Slow Inactivation in Mutant Sodium Channels." *Biophysical Journal* 71 (1). The Biophysical Society: 227–36.

Daly, J., C. Myers, J. Warnick, and E. Albuquerque. 1980. "Levels of Batrachotoxin and Lack of Sensitivity to Its Action in Poison-Dart Frogs (Phyllobates)." *Science* 208 (4450): 1383–85.

Daly, JW. 1982. "Biologically Active Alkaloids from Poison Frogs (Dendrobatidae)." *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 1 (1): 33–86.

Daly, JW., Martin G., TF. Spande, MW. Decker, JP. Sullivan, and M Williams. 2000. "Alkaloids from Frog Skin: The Discovery of Epibatidine and the Potential for Developing Novel Non-Opioid Analgesics." *Natural Product Reports* 17 (2): 131–35.

Daly, JW., HM. Garraffo, and TF. Spande. 1993. "Chapter 3 Amphibian Alkaloids." In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 185–288. doi:10.1016/S0099-9598(08)60136-4.

———. 1999. *Alkaloids from Amphibian Skins*. S.W. Pelle. New York: Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives.

Daly, JW., T. Kaneko, J. Wilham, HM. Garraffo, TF. Spande, A. Espinosa, and MA. Donnelly. 2002. "Bioactive Alkaloids of Frog Skin: Combinatorial Bioprospecting Reveals That Pumiliotoxins Have an Arthropod Source." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22). National Academy of Sciences: 13996–1.

Daly, JW., I. Karle, CW. Myers, T. Tokuyama, JA. Waters, and B. Witkop. 1971. "Histrionicotoxins: Roentgen-Ray Analysis of the Novel Allenic and Acetylenic Spiroalkaloids Isolated from a Colombian Frog, *Dendrobates Histrionicus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (8): 1870–75.

Daly, JW., H. Martin Garraffo, TF. Spande, C. Jaramillo, and A. Stanley Rand. 1994. "Dietary Source for Skin Alkaloids of Poison Frogs (Dendrobatidae)?" *Journal of Chemical Ecology* 20 (4): 943–55.

Daly, JW., and CW. Myers. 1967. "Toxicity of Panamanian Poison Frogs (*Dendrobates*): Some Biological and Chemical Aspects." *Science* 156 (3777): 970–73.

———. 1980. "Taxonomy and Ecology of *Dendrobates Bombetes*, a New Andean Poison Frog with New Skin Toxins." *American Museum of Natural History* 2692: 1–23.

Daly, JW., CW. Myers, and N. Whittaker. 1987. "Further Classification of Skin Alkaloids from Neotropical Poison Frogs (Dendrobatidae), with a General Survey of Toxic/noxious Substances in the Amphibia." *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* 25 (10): 1023–95.

Daly, JW., SI. Secunda, HM. Garraffo, TF. Spande, A. Wisnieski, and JF. Cover. 1994. "An Uptake System for Dietary Alkaloids in Poison Frogs (Dendrobatidae)." *Toxicon* 32 (6): 657–63.

Daly, JW., TF. Spande, and HM. Garraffo. 2005. "Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of over Eight-Hundred Compounds." *Journal of Natural Products* 68 (10): 1556–75.

Darst, CR., PA. Menéndez-Guerrero, LA. Coloma, and DC. Cannatella. 2005. "Evolution of Dietary Specialization and Chemical Defense in Poison Frogs (Dendrobatidae): A Comparative Analysis." *The American* 165 (1): 56–69.

Deguchi, T., and Y. Sakai. 1967. "Sustained after-Depolarization in Grayanotoxin-Treated Muscle Cell Membrane." *Nihon Seirigaku Zasshi*. 29 (4): 172–73.

Deschênes, I., E. Trottier, and M. Chahine. 2001. "Implication of the C-Terminal Region of the α -Subunit of Voltage-Gated Sodium Channels in Fast Inactivation." *Journal of Membrane Biology* 183 (2): 103–14.

Dos Reis, A. 2009. "Sigmund Freud (1856-1939) and Karl Köller (1857-1944) and the Discovery of Local Anesthesia." *Revista Brasileira de Anestesiologia* 59 (2): 244–57.

Du, Y., DP. Garden, L. Wang, BS. Zhorov, and K Dong. 2011. "Identification of New Batrachotoxin-Sensing Residues in Segment IIIS6 of the Sodium Channel." *Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 13151–60.

Dumbacher, JP., BM. Beehler, TF. Spande, HM. Garraffo, and JW. Daly. 1992. "Homobatrachotoxin in the Genus Pitohui: Chemical Defense in Birds?" *Science (New York, N.Y.)* 258 (5083): 799–801.

Dumbacher, JP., TF. Spande, and JW. Daly. 2000. "Batrachotoxin Alkaloids from Passerine Birds: A Second Toxic Bird Genus (Ifrita Kowaldi) from New Guinea." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (24): 12970–75.

Dumbacher, JP., A. Wako, A. Samuelson, TF. Spande, and JW. Daly. 2004. "Melyrid Beetles (Choresine): A Putative Source for the Batrachotoxin Alkaloids Found in Poison-Dart Frogs and Toxic Passerine Birds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45): 15857–60.

Evans, MH. 1972. "Tetrodotoxin, Saxitoxin, and Related Substances: Their Applications in Neurobiology." *International Review of Neurobiology* 15: 83–166.

Fainzilber, M., O. Kofman, E. Zlotkin, and D. Gordon. 1994. "A New Neurotoxin Receptor Site on Sodium Channels Is Identified by a Conotoxin That Affects Sodium Channel Inactivation in Molluscs and Acts as an Antagonist in Rat Brain." *Journal of Biological Chemistry* 269 (4): 2574–80.

Favre, I., E. Moczydlowski, and L. Schild. 1996. "On the Structural Basis for Ionic Selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the Voltage-Gated Sodium Channel." *Biophysical Journal* 71 (6): 3110–25.

Featherstone, DE., E. Fujimoto, and PC. Ruben. 1998. "A Defect in Skeletal Muscle Sodium Channel Deactivation Exacerbates Hyperexcitability in Human Paramyotonia Congenita." *The Journal of Physiology* 506 (Pt 3). Wiley-Blackwell: 627–38.

Fisher, M., D. Huangfu, TY. Shen, and PG. Guyenet. 1994. "Epibatidine, an Alkaloid from the Poison Frog *Epipedobates Tricolor*, Is a Powerful Ganglionic Depolarizing Agent." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270 (2): 702–7.

Fozzard, HA., PJ. Lee, and GM. Lipkind. 2005. "Mechanism of Local Anesthetic Drug Action on Voltage-Gated Sodium Channels." *Current Pharmaceutical Design* 11 (21): 2671–86.

Frank, N., and E. Ramus. 1995. *A Complete Guide to Scientific and Common Names of Reptiles and Amphibians of the World*.

Frazier, DT., T. Narahashi, and M. Yamada. 1970. "The Site of Action and Active Form of Local Anesthetics. II. Experiments with Quaternary Compounds." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 171 (1): 45–51.

Frezza, L., S. Castaño, H. Asencio, W. Sandtner, L. Fierro, F. Bezanilla, and AM. Correa. 2010. "Is the Skeletal Muscle Sodium Channel of the Batrachotoxin (BTX)-Producing *Phyllobates Aurotaenia* Poison Dart Frog Resistant to BTX?" *Biophysical Journal* 98 (3). Elsevier: 113a.

Frost, D. 2016. "Amphibian Species of the World 6.0." <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>.

Giardine, B., C. Riemer, RC. Hardison, R. Burhans, L. Elnitski, P. Shah, Y. Zhang, et al. 2005. "Galaxy: A Platform for Interactive Large-Scale Genome Analysis." *Genome Research* 15 (10): 1451–55.

Goldin, AL. 1995. "Voltage-Gated Sodium Channels." In *Ligand- and Voltage-Gated Ion Channels*, edited by Editor R.A. North, 73–112. CRC Press, Boca Raton, FL.

———. 1999. "Diversity of Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels." *Annals of the New York Academy of Sciences* 868: 38–50.

———. 2001. "Resurgence of Sodium Channel Research." *Annual Review of Physiology* 63 (1): 871–94.

———. 2002. "Evolution of Voltage-Gated Na(+) Channels." *The Journal of Experimental Biology* 205 (Pt 5): 575–84.

Goldin, AL., T. Snutch, H. Lübbert, A. Dowsett, J. Marshall, V. Auld, W. Downey, et al. 1986. "Messenger RNA Coding for Only the Alpha Subunit of the Rat Brain Na Channel Is Sufficient for Expression of Functional Channels in *Xenopus* Oocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (19): 7503–7.

Grant, T., and F. Castro. 1998. "The Cloud Forest *Colostethus* (Anura, Dendrobatidae) of a Region of the Cordillera Occidental of Colombia." *Journal of Herpetology* 32 (3): 378–92.

Grant, T., DR. Frost, JP. Caldwell, R. Gagliardo, C. Haddad, P. Kok, DB. Means, BP. Noonan, WE. Schargel, and W. Wheeler. 2006. "Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and Their Relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae)." *Bulletin of the American Museum of Natural History*, no. 299: 262.

Hartshorne, RP., and WA. Catterall. 1981. "Purification of the Saxitoxin Receptor of the Sodium Channel from Rat Brain." *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (7): 4620–24.

———. 1984. "The Sodium Channel from Rat Brain. Purification and Subunit Composition." *Journal of Biological Chemistry* 259 (3): 1667–75.

Hayward, LJ., RH. Brown, and SC. Cannon. 1997. "Slow Inactivation Differs Among Mutant Na Channels Associated with Myotonia and Periodic Paralysis." *Biophysical Journal* 72: 1204–19.

Heinemann, SH., H. Terlau, W. Stühmer, K. Imoto, and S. Numa. 1992. "Calcium Channel Characteristics Conferred on the Sodium Channel by Single Mutations." *Nature* 355 (6368): 441–43.

Herzog, WH., RM. Feibel, and SH. Bryant. 1964. "The Effect of Aconitine on the Giant Axon of the Squid." *The Journal of General Physiology* 47: 719–33.

Hille, B. 1977. "Local Anesthetics: Hydrophilic and Hydrophobic Pathways for the Drug-Receptor Reaction." *The Journal of General Physiology* 69 (4): 497–515.

———. 1988. "Evolutionary Origin of Electrical Excitability." In *Cellular Mechanisms of Conditioning and Behavioral Plasticity*, 511–18. Boston, MA: Springer US.

———. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Third Edit.

Hille, Bertil. 1989. "Ionic Channels: Evolutionary Origins and Modern Roles." *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 74 (6): 785–804. doi:10.1113/expphysiol.1989.sp003349.

Hodgkin, AL., and AF. Huxley. 1952a. "A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve." *The Journal of Physiology* 117 (4): 500–544.

———. 1952b. "The Components of Membrane Conductance in the Giant Axon of Loligo." *The Journal of Physiology* 116 (4): 473–96.

———. 1952c. "The Dual Effect of Membrane Potential on Sodium Conductance in the Giant Axon of Loligo." *The Journal of Physiology* 116 (4): 497–506.

———. 1952d. "Currents Carried by Sodium and Potassium Ions through the Membrane of the Giant Axon of Loligo." *The Journal of Physiology* 116 (4): 449–72.

Isom, LL., KS. De Jongh, DE. Patton, BF. Reber, J. Offord, H. Charbonneau, K. Walsh, AL. Goldin, and WA. Catterall. 1992. "Primary Structure and Functional Expression of the Beta 1 Subunit of the Rat Brain Sodium Channel." *Science* 256 (5058): 839–42.

Isom, LL., DS. Ragsdale, KS. De Jongh, RE. Westenbroek, BF. Reber, T. Scheuer, and WA. Catterall. 1995. "Structure and Function of the Beta 2 Subunit of Brain Sodium Channels, a Transmembrane Glycoprotein with a CAM Motif." *Cell* 83 (3): 433–42.

Jan, LY., YN. Jan, FV. Sepulveda, DR. Gill, SC. Hyde, CF. Higgins, C. Grignon, et al. 1992. "Tracing the Roots of Ion Channels." *Cell* 69 (5). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts: 715–18.

Jones, TH., JST. Gorman, RR. Snelling, JH. Delabie, MS. Blum, HM. Garrafo, P. Jain, JW. Daly, and TF. Spande. 1999. "Further Alkaloids Common to Ants and Frogs: Decahydroquinolines and a Quinolizidine." *Journal of Chemical Ecology* 25 (5): 1179–93.

Kahn, TR., E. La Marca, S. Lötters, JL. Brown, E. Twomey, and A. Amézquita. 2016. *Aposematic Poison Frogs (Dendrobatidae) of the Andean Countries: Bolivia, Colombia, Ecuador, Peru and Venezuela*. doi:10.13140/RG.2.1.3204.9360.

Kellenberger, S., JW. West, WA. Catterall, and T. Scheuer. 1997. "Molecular Analysis of Potential Hinge Residues in the Inactivation Gate of Brain Type IIA Na⁺ Channels." *The Journal of General Physiology* 109 (5): 607–17.

Khodorov, BI. 1985. "Batrachotoxin as a Tool to Study Voltage-Sensitive Sodium Channels of Excitable Membranes." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 45 (2). Pergamon: 57–148.

Khodorov, BI., EM. Peganov, SV. Revenko, and LD. Shishkova. 1975. "Sodium Currents in Voltage Clamped Nerve Fiber of Frog under the Combined Action of Batrachotoxin and Procaine." *Brain Research* 84 (3): 541–46.

Kim, YH., GB. Brown, and FA. Mosher. 1975. "Tetrodotoxin : Occurrence in Atelopid Frogs of Costa Rica." *Science* 189 (4197): 151–52.

Komai, Hirochika, and Thomas S. McDowell. 2001. *Anesthesiology*. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. Vol. 94. [American Society of Anesthesiologists, etc.].

Kondratiev, A., and GF. Tomaselli. 2003. "Altered Gating and Local Anesthetic Block Mediated by Residues in the I-S6 and II-S6 Transmembrane Segments of Voltage-Dependent Na⁺ Channels." *Molecular Pharmacology* 64 (3): 741–52.

Kosower, EM. 1983. "A Hypothesis for the Mechanism of Sodium Channel Opening by Batrachotoxin and Related Toxins." *FEBS Letters* 163 (2): 161–64.

Krayer, O., and GH. Acheson. 1946. "The Pharmacology of the Veratrum Alkaloids." *Physiological Reviews* 26 (3): 383–446.

Krueger, BK., JF. Worley, and RJ. French. 1983. "Single Sodium Channels from Rat Brain Incorporated into Planar Lipid Bilayer Membranes." *Nature* 303 (5913): 172–75.

Ku, DD., T. Akeru, M. Frank, TM. Brody, and J. Iwasa. 1977. "The Effects of Grayanotoxin I and Alpha-Dihydrograyanotoxin II on Guinea-Pig Myocardium." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 200 (2): 363–72.

Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–74.

Kumar, TA. 2013. "CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction Server." *Wide Spectrum* 1 (9): 15–19.

Lazdunski, M., C. Frelin, J. Barhanin, A. Lombet, H. Meiri, D. Pauron, G. Romey, et al. 1986. "Polypeptide Toxins as Tools to Study Voltage-Sensitive Na⁺ Channels." *Annals of the New York Academy of Sciences* 479: 204–20.

Leipold, E., A. Hansel, BM. Olivera, H. Terlau, and SH. Heinemann. 2005. "Molecular Interaction of Δ -conotoxins with Voltage-gated Sodium Channels." *FEBS Letters* 579 (18): 3881–84.

Li, HL., A. Galue, L. Meadows, and DS. Ragsdale. 1999. "A Molecular Basis for the Different Local Anesthetic Affinities of Resting Versus Open and Inactivated States of the Sodium Channel." *Molecular Pharmacology* 55 (1): 134–41.

Liebesskind, BJ., DM. Hillis, and HH. Zakon. 2011. "Evolution of Sodium Channels Predates the Origin of Nervous Systems in Animals." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 9154–59.

Linford, NJ., AR. Cantrell, Y. Qu, T. Scheuer, and WA. Catterall. 1998. "Interaction of Batrachotoxin with the Local Anesthetic Receptor Site in Transmembrane Segment IVS6 of the Voltage-Gated Sodium Channel." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23): 13947–52.

Lipicky, RJ., DL. Gilbertt, and IM. Stillmant. 1972. "Diphenylhydantoin Inhibition of Sodium Conductance in Squid Giant Axon." *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (7): 1758–60.

Lipkind, GM., and HA. Fozzard. 2005. "Molecular Modeling of Local Anesthetic Drug Binding by Voltage-Gated Sodium Channels." *Molecular Pharmacology* 68 (6): 1611–22.

———. 2008. "Voltage-Gated Na Channel Selectivity: The Role of the Conserved Domain III Lysine Residue." *The Journal of General Physiology* 131 (6): 523–29.

Lombet, A., JN. Bidard, and M. Lazdunski. 1987. "Ciguatoxin and Brevetoxins Share a Common Receptor Site on the Neuronal Voltage-dependent Na⁺ Channel." *FEBS Letters* 219 (2): 355–59.

Lötters, S., F. Glaw, J. Köhler, and F. Castro. 1999. "On the Geographic Variation of the Advertisement Call of *Dendrobates Histrionicus* BERTHOLD, 1845 and Related Forms from North-Western South America." *Herpetozoa* 12: 23–38.

McCollum, IJ., YY. Vilin, E. Spackman, E. Fujimoto, and PC. Ruben. 2003. "Negatively Charged Residues Adjacent to IFM Motif in the DIII-DIV Linker of hNa(V)1.4 Differentially Affect Slow Inactivation." *FEBS Letters* 552 (2–3): 163–69.

Mccusker, EC., C. Bagn  ris, CE. Naylor, AR. Cole, N. D 'avanzo, CG. Nichols, and BA. Wallace. 2012. "Structure of a Bacterial Voltage-Gated Sodium Channel Pore Reveals Mechanisms of Opening and Closing." *Nature Communications* 3. doi:10.1038/ncomms2077.

Meves, H., N. Rubly, and DD. Watt. 1982. "Effect of Toxins Isolated from the Venom of the Scorpion *Centruroides Sculpturatus* on the Na Currents of the Node of Ranvier." *Pflügers*

Archiv: European Journal of Physiology 393 (1): 56–62.

Milkman, R. 1994. "An Escherichia Coli Homologue of Eukaryotic Potassium Channel Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (9). National Academy of Sciences: 3510–14.

Miller, JR., MK. Patel, JE. John, JP. Mounsey, and JR. Moorman. 2000. "Contributions of Charged Residues in a Cytoplasmic Linking Region to Na Channel Gating." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1509 (1–2). Elsevier: 275–91.

Miller, MA., W. Pfeiffer, and T. Schwartz. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees." *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*. doi:10.1109/GCE.2010.5676129.

Mitrovic, N., AL. George, and R. Horn. 2000. "Role of Domain 4 in Sodium Channel Slow Inactivation." *The Journal of General Physiology* 115 (6). The Rockefeller University Press: 707–18.

Myers, C.W, J.W Daly, and Malkin B. 1978. "A Dangerously Toxic New Frog (Phylllobates) Used by Emberá Indians of Western Colombia. with Discussion of Blowgun Fabrication and Dart Poisoning." *Bull. Am. Mus. Nat. Hist*, 307–66.

Myers, CW., and JW. Daly. 1976. "Preliminary Evaluation of Skin Toxins and Vocalizations in Taxonomic and Evolutionary Studies of Poison-Dart Frogs (Dendrobatidae)." *Bulletin of the American Museum of Natural History*.

———. 1983. "Dart-Poison Frogs." *Scientific American* 248 (2): 120–33.

Narahashi, T., EX. Albuquerque, and T. Deguchi. 1971. "Effects of Batrachotoxin on Membrane Potential and Conductance of Squid Giant Axons." *The Journal of General Physiology* 58 (1): 54–70.

Narahashi, T., JW. Moore, and WR. Scott. 1964. "Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons." *The Journal of General Physiology* 47: 965–74.

Narahashi, T., and I. Seyama. 1974. "Mechanism of Nerve Membrane Depolarization Caused by Grayanotoxin I." *The Journal of Physiology* 242 (2): 471–87.

Nau, C., SY. Wang, GR. Strichartz, and GK. Wang. 1999. "Point Mutations at N434 in D1-S6 of $\mu 1$ Na(+) Channels Modulate Binding Affinity and Stereoselectivity of Local Anesthetic Enantiomers." *Molecular Pharmacology* 56: 404–13.

Neuwirth, M., JW. Daly, CW. Myers, and LW. Tice. 1979. "Morphology of the Granular Secretory Glands in Skin of Poison-Dart Frogs (Dendrobatidae)." *Tissue & Cell* 11 (4): 755–71.

Noda, M., T. Ikeda, H. Suzuki, H. Takeshima, T. Takahashi, M. Kuno, and S. Numa. 1986. "Expression of Functional Sodium Channels from Cloned cDNA." *Nature* 322: 826–28.

Noda, M., S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, et al. 1984. "Primary Structure of Electrophorus Electricus Sodium Channel Deduced from cDNA Sequence." *Nature* 312: 121–27.

Noda, M., H. Suzuki, S. Numa, and W. Stühmer. 1989. "A Single Point Mutation Confers Tetrodotoxin and Saxitoxin Insensitivity on the Sodium Channel II." *FEBS Letters* 259 (1): 213–16.

O'Reilly, JP., Sho-Ya. Wang, and GK. Wang. 2001. "Residue-Specific Effects on Slow Inactivation at V787 in D2-S6 of Nav1.4 Sodium Channels." *Biophysical Journal* 81 (4). Cell Press: 2100–2111.

Okamoto, H., K. Takahashi, and N. Yamashita. 1977. "One-to-One Binding of a Purified Scorpion Toxin to Na Channels." *Nature* 266 (5601): 465–68.

Olschewski, A., ME. Bräu, H. Olschewski, G. Hempelmann, and W. Vogel. 1996. "ATP-Dependent Potassium Channel in Rat Cardiomyocytes Is Blocked by Lidocaine. Possible Impact on the Antiarrhythmic Action of Lidocaine." *Circulation* 93 (4): 656–59.

Olschewski, A., H. Olschewski, ME. Bräu, G. Hempelmann, W. Vogel, and BV. Safronov. 1999. "Effect of Bupivacaine on ATP-Dependent Potassium Channels in Rat Cardiomyocytes." *British Journal of Anaesthesia* 82 (3): 435–38.

Omasits, U., CH. Ahrens, S. Müller, and B. Wollscheid. 2014. "Protter: Interactive Protein Feature Visualization and Integration with Experimental Proteomic Data." *Bioinformatics* 30 (6). Oxford University Press: 884–86.

Ong, BH., GF. Tomaselli, and JR. Balser. 2000. "A Structural Rearrangement in the Sodium Channel Pore Linked to Slow Inactivation and Use Dependence." *The Journal of General Physiology* 116 (5). The Rockefeller University Press: 653–62.

Payandeh, J., TM. Gamal El-Din, T. Scheuer, N. Zheng, and WA. Catterall. 2012. "Crystal Structure of a Voltage-Gated Sodium Channel in Two Potentially Inactivated States." *Nature* 486 (May): 135–39.

Payandeh, J., T. Scheuer, N. Zheng, and WA. Catterall. 2011. "The Crystal Structure of a Voltage-Gated Sodium Channel." *Nature* 475 (7356). Nature Publishing Group: 353–58.

Peper, K., and W. Trautwein. 1967. "The Effect of Aconitine on the Membrane Current in Cardiac Muscle." *Pflüger's Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere* 296 (4): 328–36.

Poli, MA., TJ. Mende, and DG. Baden. 1986. "Brevetoxins, Unique Activators of Voltage-Sensitive Sodium Channels, Bind to Specific Sites in Rat Brain Synaptosomes." *Molecular Pharmacology* 30 (2): 129–35.

Postma, SW., and WA. Catterall. 1984. "Inhibition of Binding of [3H]batrachotoxinin A 20-Alpha-Benzoate to Sodium Channels by Local Anesthetics." *Molecular Pharmacology* 25 (2): 219–27.

Ragsdale, DS., JC. Mcphee, T. Scheuer, and WA. Catterall. 1994. "Molecular Determinants of State-Dependent Block of Na⁺ Channels by Local Anesthetics." *Science* 265 (5179): 1724–28.

———. 1996. "Common Molecular Determinants of Local Anesthetic, Antiarrhythmic, and Anticonvulsant Block of Voltage-Gated Na⁺ Channels." *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (17): 9270–75.

Rambaut, A. 2007. "Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. FigTree v1.4.3." <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Ray, R., CS. Morrow, and WA. Catterall. 1978. "Binding of Scorpion Toxin to Receptor Sites Associated with Voltage-Sensitive Sodium Channels in Synaptic Nerve Ending Particles." *Journal of Biological Chemistry* 253 (20): 7307–13.

Ren, D., B. Navarro, H. Xu, L. Yue, Q. Shi, and DE. Clapham. 2001. "A Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channel." *Science* 294 (5550): 2372–75.

Richmond, JE., DE. Featherstone, HA. Hartmann, and PC. Ruben. 1998. "Slow Inactivation in Human Cardiac Sodium Channels." *Biophysical Journal* 74 (6): 2945–52.

Ritchie, JM., and RB. Rogart. 1977. "The Binding of Saxitoxin and Tetrodotoxin to Excitable Tissue." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 79: 1–50.

Rogers, JC., Y. Qu, TN. Tanada, T. Scheuer, and WA. Catterall. 1996. "Molecular Determinants of High Affinity Binding of Alpha-Scorpion Toxin and Sea Anemone Toxin in the S3-S4 Extracellular Loop in Domain IV of the Na⁺ Channel Alpha Subunit." *Journal of Biological Chemistry* 271 (27): 15950–62.

Rohl, CA., FA. Boeckman, C. Baker, T. Scheuer, WA. Catterall, and RE. Klevit. 1999. "Solution Structure of the Sodium Channel Inactivation Gate." *Biochemistry* 38 (3): 855–61.

Romey, G., R. Chicheportiche, M. Lazdunski, H. Rochat, F. Miranda, and S. Lissitzky. 1975. "Scorpion Neurotoxin — A Presynaptic Toxin Which Affects Both Na⁺ and K⁺ Channels in Axons." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 64 (1). Academic Press: 115–21.

Ruben, PC. 2014. *Voltage Gated Sodium Channels. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 221.

Ruetsch, Y., T. Boni, and A. Borgeat. 2001. "From Cocaine to Ropivacaine: The History of Local Anesthetic Drugs." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1 (3): 175–82.

Saporito, RA., and HM. Garraffo. 2004. "Formicine Ants: An Arthropod Source for the Pumiliotoxin Alkaloids of Dendrobatid Poison Frogs." *Proceedings of the National of Sciences of the United States of America* 101 (21): 8045–50.

Sato, C., Y. Ueno, K. Asai, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel, and Y. Fujiyoshi. 2001. "The Voltage-Sensitive Sodium Channel Is a Bell-Shaped Molecule with Several Cavities." *Nature* 409 (6823): 1047–51.

Schantz, EJ. 1986. "Chemistry and Biology of Saxitoxin and Related Toxins." *Annals of the New York Academy of Sciences* 479 (December). Blackwell Publishing Ltd: 15–23.

Scheuer, T. 2014. "Bacterial Sodium Channels: Models for Eukaryotic Sodium and Calcium Channels." In *Handbook of Experimental Pharmacology*, 269–91.

Schmidt, H., and O. Schmitt. 1974. "Effect of Aconitine on the Sodium Permeability of the Node of Ranvier." *Pflügers Archiv* 349 (2): 133–48.

Schmidtmayer, J., and W. Ulbricht. 1980. "Interaction of Lidocaine and Benzocaine in Blocking Sodium Channels." *European Journal of Physiology* 387 (1): 47–54.

Scholz, A. 2002. "Mechanisms of (Local) Anaesthetics on Voltage-Gated Sodium and Other Ion Channels." *British Journal of Anaesthesia* 89 (1): 52–61.

Seyama, I., and T. Narahashi. 1973. "Increase in Sodium Permeability of Squid Axon Membranes by α -Dihydrograyanotoxin II." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 184 (2): 299–307.

Shaya, D., F. Findeisen, F. Abderemane-Ali, C. Arrigoni, S. Wong, SR. Nurva, G. Loussouarn, and DL. Minor. 2014. "Structure of a Prokaryotic Sodium Channel Pore Reveals Essential Gating Elements and an Outer Ion Binding Site Common to Eukaryotic Channels." *Journal of Molecular Biology* 426 (2): 467–83.

Shen, H., Q. Zhou, X. Pan, Z. Li, J. Wu, and N. Yan. 2017. "Structure of a Eukaryotic Voltage-Gated Sodium Channel at near-Atomic Resolution." *Science*, 1–19.

Sheumack, DD., ME. Howden, I. Spence, and RJ. Quinn. 1978. "Maculotoxin: A Neurotoxin from the Venom Glands of the Octopus *Hapalochlaena Maculosa* Identified as Tetrodotoxin." *Science* 199 (4325): 188–89.

Silverstone, PA. 1975. *A Revision of the Poison-Arrow Frogs of the Genus Dendrobates Wagler. Natural History Museum.*

———. 1976. "A Revision of the Poison-Arrow Frogs of the Genus *Phyllobates* Family Dendrobatidae." *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin* 27: 1–53.

Smerilli, ÁL., and NJ. Sacot. 2004. "Anestésicos Locales: Historia, Acción Farmacológica, Mecanismo de Acción, Estructura Química Y Reacciones Adversas." *Revista de La Facultad de Odontología - UBA* 19 (46): 19–24.

Smith, MR., and AL. Goldin. 1997. "Interaction between the Sodium Channel Inactivation Linker and Domain III S4-S5." *Biophysical Journal* 73 (4). The Biophysical Society: 1885–95.

Spafford, JD., AN. Spencer, and WJ. Gallin. 1999. "Genomic Organization of a Voltage-Gated Na⁺ Channel in a Hydrozoan Jellyfish: Insights into the Evolution of Voltage-Gated Na⁺ Channel Genes." *Receptors & Channels* 6 (6): 493–506.

Starmer, CF., AO. Grant, and HC. Strauss. 1984. "Mechanisms of Use-Dependent Block of Sodium Channels in Excitable Membranes by Local Anesthetics." *Biophysical Journal* 46 (1): 15–27.

Strichartz, G., T. Rando, and GK. Wang. 1987. "An Integrated View of the Molecular Toxinology of Sodium Channel Gating in Excitable Cells." *Annual Review of Neuroscience* 10: 237–67.

Strong, M., KG. Chandy, and GA. Gutman. 1993. "Molecular Evolution of Voltage-Sensitive Ion Channel Genes: On the Origins of Electrical Excitability." *Molecular Biology and Evolution* 10 (1): 221–42.

Struyk, AF., KA. Scoggan, DE. Bulman, and SC. Cannon. 2000. "The Human Skeletal Muscle Na Channel Mutation R669H Associated with Hypokalemic Periodic Paralysis Enhances Slow Inactivation." *The Journal of Neuroscience* 20 (23): 8610–17.

Sugiyama, K., and T. Muteki. 1994. "Local Anesthetics Depress the Calcium Current of Rat Sensory Neurons in Culture." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 80 (6). [American Society of Anesthesiologists, etc.]: 1369–78.

Summers, K., and ME. Clough. 2001. "The Evolution of Coloration and Toxicity in the Poison Frog Family (Dendrobatidae)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (11): 6227–32.

Sunami, A., SC. Dudley, and HA. Fozzard. 1997. "Sodium Channel Selectivity Filter Regulates Antiarrhythmic Drug Binding." *Pharmacology* 94: 14126–31.

Suppiramaniam, V., EA. Abdel-Rahman, and K. Buabeid, MA. Parameshwaran. 2010. "Nervous System and Behavioral Toxicology." In *Comprehensive Toxicology*. Elsevier.

Takada, W., T. Sakata, S. Shimano, Y. Enami, N. Mori, R. Nishida, and Y. Kuwahara. 2005. "Scheloribatid Mites as the Source of Pumiliotoxins in Dendrobatid Frogs†." *Journal of Chemical Ecology* 31 (10): 2403–15.

Tang, L., TM. Gamal El-Din, J. Payandeh, GQ. Martinez, TM. Heard, T. Scheuer, N. Zheng, and WA. Catterall. 2014. "Structural Basis for Ca²⁺ Selectivity of a Voltage-Gated Calcium Channel." *Nature* 505 (7481). Nature Publishing Group: 56–61.

Tarvin, RD., JC. Santos, LA. O'Connell, HH. Zakon, and DC. Cannatella. 2016. "Convergent Substitutions in a Sodium Channel Suggest Multiple Origins of Toxin Resistance in Poison Frogs." *Molecular Biology and Evolution* 33 (4): 1068–81.

Terlau, H., SH. Heinemann, W. Stühmer, M. Pusch, F. Conti, K. Imoto, and S. Numa. 1991. "Mapping the Site of Block by Tetrodotoxin and Saxitoxin of Sodium Channel II." *FEBS Letters* 293 (1–2): 93–96.

"The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2. International Union for the Conservation of Nature (IUCN)." 2016. <http://www.iucnredlist.org>.

Tikhonov, DB., and BS. Zhorov. 2005. "Sodium Channel Activators: Model of Binding inside the Pore and a Possible Mechanism of Action." *FEBS Letters* 579 (20): 4207–12.

Todt, H., SC. Dudley, JW. Kyle, RJ. French, and HA. Fozzard. 1999. "Ultra-Slow Inactivation in $\mu 1$ Na⁺ Channels Is Produced by a Structural Rearrangement of the Outer Vestibule." *Biophysical Journal* 76 (3): 1335–45.

Trainer, VL., GB. Brown, and WA. Catterall. 1996. "Site of Covalent Labeling by a Photoreactive Batrachotoxin Derivative near Transmembrane Segment IS6 of the Sodium Channel Subunit." *Journal of Biological Chemistry* 271 (19): 11261–67.

Trainer, VL., WJ. Thomsen, WA. Catterall, and DG. Baden. 1991. "Photoaffinity Labeling of the Brevetoxin Receptor on Sodium Channels in Rat Brain Synaptosomes." *Molecular Pharmacology* 40 (6): 988–94.

Tsai, C-J., K. Tani, K. Irie, Y. Hiroaki, T. Shimomura, DG. McMillan, GM. Cook, GF. Schertler, Y. Fujiyoshi, and X-D. Li. 2013. "Two Alternative Conformations of a Voltage-Gated Sodium Channel." *Journal of Molecular Biology* 425 (22): 4074–88.

Ulbricht, W. 1969. "The Effect of Veratridine on Excitable Membranes of Nerve and Muscle." *Ergebnisse Der Physiologie, Biologischen Chemie Und Experimentellen Pharmakologie* 61: 18–71.

———. 1981. "Kinetics of Drug Action and Equilibrium Results at the Node of Ranvier." *Physiological Reviews* 61 (4): 785–828.

———. 2005. "Sodium Channel Inactivation: Molecular Determinants and Modulation." *Physiological Reviews* 85 (4): 1271–1301.

Vassilev, PM., T. Scheuer, and WA. Catterall. 1988. "Identification of an Intracellular Peptide Segment Involved in Sodium Channel Inactivation." *Science* 241 (4873): 1658–61.

Vedantham, V., and SC. Cannon. 2000. "Rapid and Slow Voltage-Dependent Conformational Changes in Segment IVS6 of Voltage-Gated Na(+) Channels." *Biophysical Journal* 78 (6): 2943–58.

Vien, TN., and PG. DeCaen. 2016. "Biophysical Adaptations of Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channels." In *Current Topics in Membranes*, 78:39–64. Elsevier Ltd.

Vilin, YY., E. Fujimoto, and PC. Ruben. 2001. "A Single Residue Differentiates between Human Cardiac and Skeletal Muscle Na⁺ Channel Slow Inactivation." *Biophysical Journal* 80 (5): 2221–30.

Wang, GK. 1988. "Cocaine-Induced Closures of Single Batrachotoxin-Activated Na⁺ Channels in Planar Lipid Bilayers." *The Journal of General Physiology* 92 (6). The Rockefeller University Press: 747–65.

Wang, GK., C. Quan, and Sho-Ya. Wang. 1998. "Local Anesthetic Block of Batrachotoxin-Resistant Muscle Na⁺ Channels." *Molecular Pharmacology* 54 (2): 389–96.

Wang, S-Y., M. Barile, and GK. Wang. 2001. "Disparate Role of Na(+) Channel D2-S6 Residues in Batrachotoxin and Local Anesthetic Action." *Molecular Pharmacology* 59 (5): 1100–1107.

Wang, S-Y., J. Mitchell, DB. Tikhonov, BS. Zhorov, and GK. Wang. 2006. "How Batrachotoxin Modifies the Sodium Channel Permeation Pathway: Computer Modeling

and Site-Directed Mutagenesis." *Molecular Pharmacology* 69 (3): 788–95.

Wang, S-Y., C. Nau, and GK. Wang. 2000. "Residues in Na(+) Channel D3-S6 Segment Modulate Both Batrachotoxin and Local Anesthetic Affinities." *Biophysical Journal* 79 (3): 1379–87.

Wang, S-Y., and GK. Wang. 1996. "Slow Inactivation of Muscle $\mu 1$ Na⁺ Channels in Permanently Transfected Mammalian Cells." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 432 (4): 692–99.

———. 1998. "Point Mutations in Segment I-S6 Render Voltage-Gated Na⁺ Channels Resistant to Batrachotoxin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5): 2653–58.

———. 1999. "Batrachotoxin-Resistant Na⁺ Channels Derived from Point Mutations in Transmembrane Segment D4-S6." *Biophysical Journal* 76 (6): 3141–49.

Wang, SY, and GK Wang. 1998. "Point Mutations in Segment I-S6 Render Voltage-Gated Na⁺ Channels Resistant to Batrachotoxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (5): 2653–58.

Watanabe, E., A. Fujikawa, H. Matsunaga, Y. Yasoshima, N. Sako, T. Yamamoto, C. Saegusa, and M. Noda. 2000. "Nav2/NaG Channel Is Involved in Control of Salt-Intake Behavior in the CNS." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (20): 7743–51.

Wildsmith, JA. 1985. "Origins of Local Anaesthesia." *Journal of the Royal Society of Medicine* 78 (January): 6–7.

Xiong, W., RA. Li, Y. Tian, and GF. Tomaselli. 2003. "Molecular Motions of the Outer Ring of Charge of the Sodium Channel: Do They Couple to Slow Inactivation?" *The Journal of General Physiology J. Gen. Physiol* 122: 323–32.

Xiong, Z., and GR. Strichartz. 1998. "Inhibition by Local Anesthetics of Ca²⁺ Channels in Rat Anterior Pituitary Cells." *European Journal of Pharmacology* 363 (1): 81–90.

Yarov-Yarovoy, V., J. Brown, EM. Sharp, JJ. Clare, T. Scheuer, and WA. Catterall. 2001. "Molecular Determinants of Voltage-Dependent Gating and Binding of Pore-Blocking Drugs in Transmembrane Segment IIIS6 of the Na⁺ Channel Alpha Subunit." *Journal of Biological Chemistry* 276 (1): 20–27.

Yarov-Yarovoy, V., JC. McPhee, and D. Idsvoog. 2002. "Role of Amino Acid Residues in Transmembrane Segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ Channel α Subunit in Voltage-Dependent Gating and Drug Block." *Journal of Biological Chemistry* 277 (38): 35393–401.

Yasumoto, T., H. Nagai, D. Yasumura, T. Michishita, A. Endo, M. Yotsu, and Y. Kotaki. 1986. "Interspecies Distribution and Possible Origin of Tetrodotoxin." *Annals of the New York Academy of Sciences* 479 (December): 44–51.

Zakon, HH. 2012. "Adaptive Evolution of Voltage-Gated Sodium Channels: The First 800 Million Years." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 10619–25.

Zhang, X., W. Ren, P. DeCaen, C. Yan, X. Tao, L. Tang, J. Wang, et al. 2012. "Crystal Structure of an Orthologue of the NaChBac Voltage-Gated Sodium Channel." *Nature* 485 (May): 130–34.

Zhang, Z., Y. Xu, PH. Dong, D. Sharma, and N. Chiamvimonvat. 2003. "A Negatively Charged Residue in the Outer Mouth of Rat Sodium Channel Determines the Gating Kinetics of the Channel." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 284 (5): C1247–54.

Zhao, Y., V. Yarov-Yarovoy, T. Scheuer, and WA. Catterall. 2004. "A Gating Hinge in Na⁺ Channels: A Molecular Switch for Electrical Signaling." *Neuron* 41: 859–65.

Zhou, W., I. Chung, Z. Liu, AL. Goldin, and K. Dong. 2004. "A Voltage-Gated Calcium-Selective Channel Encoded by a Sodium Channel-like Gene." *Neuron* 42 (1): 101–12.